UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 205

PÉNICILLINES & PÉNICILLINASE

Etude Bactériologique

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962

PAR

Alain FAVAREL

Diplômé de Bactériologie, Hématologie, Parasitologie et Sérologie

Membres du Jury :

Profrs	ANDRIEU	*Président*
	CAUJOLLE	*Assesseurs*
	BOUISSET	
	MONNIER	
	DOUSTE-BLAZY	*Suppléant*

TOULOUSE

LES IMPRESSIONS OFFTYP

11, RUE SAINT-PAPOUL

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0037

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 205

PÉNICILLINES & PÉNICILLINASE

Etude Bactériologique

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962

PAR

Alain FAVAREL

Diplômé de Bactériologie, Hématologie, Parasitologie et Sérologie

Membres du Jury :

- Profs ANDRIEU — *Président*
- CAUJOLLE, BOUISSET, MONNIER — *Assesseurs*
- DOUSTE-BLAZY — *Suppléant*

TOULOUSE

LES IMPRESSIONS OFFTYP

11, RUE SAINT-PAPOUL

1962

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen. . . . . MM. LAZORTHES.
Assesseur. . . . . BLANC.
Doyens honoraires. . . . . GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

Professeurs honoraires :

MM. RIBAUT, VALLOIS, CLERMONT, NANTA, DUCUING, TAPIE, DELAS, RISER, SOULA.

SECTION MÉDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale.	MM. MÉRIEL. GADRAT.
Clinique chirurgicale et Gynécologique.	FABRE (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer.	GRIMOUD.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.	VIRENQUE.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques.	BAZEX.
Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne. . . .	MOREL.
Clinique des Maladies des Voies urinaires.	LHEZ.
Clinique médicale infantile et Puériculture.	SOREL.
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.	GÉRAUD.
Clinique obstétricale.	GUILHEM.
Clinique odonto-stomatologique. . .	CADENAT (E.).
Clinique ophtalmologique.	CALMETTES.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale.	CALVET.
Clinique rhumatologique.	RUFFIÉ.
Clinique traumatologique des membres.	RIEUNAU.
Accouchement et obstétricie sociale.	PONTONNIER.
Anatomie.	LAZORTHES.
Anatomie appliquée.	POULHÈS.
Anatomie pathologique.	FABRE (J.).
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.	ANDRIEU.
Chimie biologique.	VALDIGUIÉ.
Electro-Radiologie.	MARQUÈS.
Embryologie générale.	BROUSSY.
Histologie.	BIMES.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie.	DARNAUD.
Médecine Légale et du Travail. . .	PLANQUES.
Médecine Sociale.	BONHOURE.
Parasitologie.	BOUISSET.
Pathologie chirurgicale.	DAMBRIN.
Pathologie générale et Médecine expérimentale.	SENDRAIL.
Physico-Chimie.	AUVERGNAT.
Physiologie.	LAPORTE (Y.).
Physiologie appliquée et Pharmacologie.	BAISSET.
Physique biologique et médicale. .	BUGNARD.
Propédeutique médicale.	
Thérapeutique.	DARDENNE.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée. .	MM. COULOUMA.
Pathologie médicale.	LAPORTE (J.).
Bactériologie.	Mme ENJALBERT.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	DOUSTE-BLAZY.
Physique médicale.	BRU.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie.	MM. BASTIDE.
Anatomie pathologique.	BOUISSOU.
Histologie et embryologie.	PLANEL.
Parasitologie.	RUFFIÉ (J.).
Physiologie.	MONTASTRUC.

AGRÉGÉS

Pathologie médicale.	MM. MONNIER. RIBAUT. DELAUDE. CALAZEL. RASCOL.
Pathologie chirurgicale.	ENJALBERT. FICAT. PASQUIÉ. SOUQUET. SARRAZIN.
Médecine Légale.	GRÈZES-RUEFF.
Odontostomatologie.	CADENAT (H.).
Pédiatrie.	BARDIER.

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie.	MM. THOMAS.
Ophtalmologie.	DÉODATI.
O.R.L.	CLAUX.
Pathologie chirurgicale.	DIEULAFÉ.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie.	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle.	MM. BOURBON.
Chimie pharmaceutique.	BLANC
Histoire naturelle.	
Matière médicale.	VINCENT.
Pharmacie chimique et pharmacodynamie.	CAUJOLLE.
Pharmacie galénique.	STANISLAS.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Zoologie.	ROUX.
Pharmacie.	M. COUTURIER.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles.	Mme CAUJOLLE.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Microbiologie.	MM. BREUILLAUD.
Sciences physiques.	PITET.
Toxicologie.	BROUSSY.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal.	MM. ROCHE.
Secrétaire.	BERRUT.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

A MA FEMME

A MES ENFANTS

Caroline, Corinne, Béatrice

A MA MÈRE

A MON PÈRE

Dont l'équilibre, l'acharnement au travail et les preuves répétées d'affection profonde m'ont toujours soutenu dans mes efforts.

A LA GRAND'MÈRE DE MA FEMME, A. JORDAN

Avec ma profonde admiration et ma plus vive affection.

A MON GRAND-PÈRE, ÉMILE GÉNIE

Dont les qualités morales et intellectuelles m'ont servi d'exemple.

A MON GRAND-ONCLE, GÉO FAVAREL

Dont les patients et remarquables travaux entomologiques affermirent en moi le goût de la recherche.

A MON ONCLE, GEORGES LAJOINIE

Qui m'aida et me conseilla toujours dans la voie qu'il m'avait si bien tracée.

A TOUTE MA FAMILLE ET MA BELLE-FAMILLE

Avec toute mon affection.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale,
Officier de la Légion d'honneur.

Vous nous avez d'abord fait le grand honneur de nous compter parmi vos élèves, puis vous nous avez accordé le privilège de pouvoir travailler dans votre laboratoire.

Veuillez trouver en tête de ce travail l'expression de notre vive gratitude et de notre respectueux attachement.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CAUJOLLE

Professeur de Pharmacie,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'honneur.

Nous vous remercions d'accepter de siéger à notre jury de thèse. Nous sommes heureux de témoigner ici de notre admiration pour la clarté de l'enseignement que vous nous avez prodigué.

MONSIEUR LE PROFESSEUR BOUISSET

Professeur de Parasitologie,
Officier de la Légion d'honneur.

Vous avez su éveiller en nous le goût de la Bactériologie. Nous sommes fiers de vous compter dans notre jury de thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES MONNIER

Professeur agrégé de Médecine Générale,
Médecin des Hôpitaux.

Vous nous avez fait le très grand honneur de nous accepter dans votre remarquable équipe bactériologique qui fait la renommée de l'école toulousaine d'antibiotiques. Vous nous avez communiqué votre passion pour ce magnifique domaine de la Thérapeutique et vous nous avez continuellement entouré de vos inestimables conseils et de votre parfaite connaissance de la question.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond attachement et de notre immense reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

Professeur à la Faculté.

Témoignage d'une ancienne et fidèle amitié.

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

A MADAME LE PROFESSEUR L. ENJALBERT

Professeur à la Faculté.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROGER BOURSE

Dont l'aide toujours spontanée et les conseils de techniques judicieux nous ont été infiniment précieux.
Veuillez croire à la sincérité des sentiments qui nous lient à vous.

A MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES AVERSENQ

Chef de Travaux de Bactériologie.

A MONSIEUR LE DOCTEUR LEVRAT

Assistant d'hygiène.

A MADAME LE DOCTEUR M.-B. LARENG

Assistant de Bactériologie.

A MADEMOISELLE J. ONFRAY

ET MADAME J. CARBONNE

En remerciement de leur gentillesse quotidienne, de leur aide efficace dans la réalisation pratique de ce travail.
Qu'elles veuillent trouver ici l'expression de notre respectueuse amitié.

A TOUS NOS AMIS

DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A NOS AMIS

INTRODUCTION

Trois grandes dates marquent l'histoire de la pénicilline :

1929, découverte de la pénicilline G par Sir Alexander FLEMING;

1939, purification et concentration de l'antibiotique par FLOREY, ABRAHAM, CHAIN et HEATLEY d'Oxford, et début de son expérimentation clinique;

1959, hémisynthèse d'un dérivé de la pénicilline pratiquement insensible à la pénicillinase par de nouveaux chercheurs anglo-saxons: BATCHELOR, DOYLE, NAYLER et ROLINSON, sous l'impulsion de CHAIN.

*La pénicillinase, enzyme bactérien inactivant la pénicilline G, constitua jusqu'à la découverte récente de BATCHELOR et ses collaborateurs (1959), un des problèmes majeurs de ce domaine de l'antibiothérapie. Reprenons-en brièvement l'histoire à son début. La découverte de bactéries insensibles à la pénicilline G, notamment parmi les bacilles gram-négatifs, incite ABRAHAM et CHAIN à chercher une explication enzymatique à ce phénomène. Ainsi, dès 1940, ils isolent dans une culture d'*Escherichia coli, *un enzyme directement responsable de l'inactivation de la pénicilline G par les bactéries et le désignent du nom de « pénicillinase ».*

L'intérêt de cette question prend une importance accrûe lorsqu'on constate que, même au sein des bactéries gram-

positives, et précisément parmi les staphylocoques, ceux-là même qui ont permis à FLEMING de faire son extraordinaire découverte, se trouvent aussi des souches productrices de pénicillinase. L'attention se porte alors essentiellement sur l'enzyme de ces dernières bactéries, étant donné l'importance croissante des staphylocoques en pathologie humaine. En effet, dès la mise en circulation de la pénicilline G, on assista assez rapidement à l'émergence, au sein des populations de staphylocoques sensibles, de souches pénicillino-résistantes particulièrement redoutables. Phénomène qui s'explique précisément par la présence fortuite dans le matériel enzymatique génotypique de ces dernières souches, d'une pénicillinase. Ce fait extraordinaire se révèlera d'ailleurs unique dans toute l'antibiothérapie.

Sans attendre, les laboratoires de recherche se mirent au travail et de nouveaux antibiotiques efficaces (chloramphénicol, tétracyclines, érythromycine, oléandomycine, novobiocine, kanamycine...) virent le jour. Malheureusement, les uns sont d'un maniement délicat, les autres ne sont pas bactéricides et, de plus, sont capables de faire naître assez rapidement une résistance acquise de la part des staphylocoques.

Aussi, parallèlement, les recherches se poursuivaient inlassablement, notamment du côté de la pénicilline, en modifiant sa chaîne latérale dans la mesure du possible, grâce à l'addition de « précurseurs » en particulier, mais sans grand succès.

Par contre, un pas décisif fut franchi à nouveau dans le domaine de la pénicilline en 1958-1959 grâce à BATCHELOR et ses collaborateurs. Ils parvinrent, en effet, à isoler en grande quantité le noyau chimique de la molécule de pénicilline, découverte inespérée pour les chimistes, car matière première idéale pour la mise au point de pénicillines nouvelles. En effet, possédant le moyen d'obtenir ce noyau à l'échelle industrielle, on pouvait dès lors se libérer partiellement de la nature (c'est-à-dire ne plus passer par l'intermédiaire de moisissures et de précurseurs capricieux) et

greffer à volonté sur ce dernier les chaînes latérales les plus variées, jusqu'à ce qu'on synthétise enfin la molécule anti-staphylococcique idéale. Le résultat ne se fait pas attendre et les chercheurs britanniques découvrent bientôt que la 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline constitue une première étape très encourageante dans cette voie.

Voilà donc brossée à grands traits l'histoire de la pénicillinase. Comme on le voit, le problème qu'elle fit naître, celui de la fréquence croissante et de l'embarrassante thérapeutique des staphylococcies à germes producteurs de pénicillinase, se trouve maintenant en grande partie résolu; et même si ce succès thérapeutique fort encourageant n'est que provisoire, il fait rebondir un problème de bactériologie pure et d'enzymologie sous-jacent au premier (problème de génétique bactérienne, de cinétique enzymatique, d'induction...). Ce problème touche d'ailleurs la pénicillinase en général, qu'elle tire son origine du staphylocoque, d'une bactérie du genre Bacillus *ou de tout autre microorganisme producteur. Mais, répétons-le, le regain d'intérêt se manifestant autour de cet enzyme découle avant tout de la soudaine insensibilité relative manifestée à son égard par une molécule différant assez peu de la pénicilline de FLEMING; et une foule de questions se posent maintenant, constituant autant de sujets de travail.*

C'est ici précisément que se situe notre modeste contribution à l'étude de la pénicillinase et nous tenons tout particulièrement à remercier ici notre Maître, le Professeur Jacques MONNIER, de nous avoir fait l'honneur de nous guider dans cette voie qu'il connaît bien, puisqu'elle constitua déjà le sujet de sa thèse. Dès la fin de 1959, pressentant ce bouleversement dans le domaine de la pénicilline, il nous incitait à mettre au point une méthode d'étude rationnelle et purement bactériologique de la réaction pénicilline-pénicillinase.

Pour tenter de parvenir à ce premier but, nous avons entrepris une étude comparative du comportement de la 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline, de la benzyl-pénicil-

line, de la phénoxy-méthyl-pénicilline et de la phénoxy-éthyl-pénicilline en face de la pénicillinase de Bacillus cereus, *une des rares pénicillinases stériles dont on dispose à l'heure actuelle.*

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mettre au point une méthode permettant de rechercher et de focaliser l'action inhibitrice de certains sels minéraux et organiques sur la pénicillinase de Bacillus cereus *en contrôlant au passage leur action inhibitrice éventuelle sur les pénicillines elles-mêmes.*

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux personnels d'une brève revue générale sur les pénicillines utilisées à l'heure actuelle en France, puis d'une seconde plus complète sur la pénicillinase en général.

A la lumière de toutes ces données, nous essaierons de discuter des hypothèses pouvant expliquer l'extraordinaire insensibilité relative de la 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline à l'égard de la pénicillinase, de l'avenir de cette nouvelle pénicilline, enfin des espoirs qu'elle fait naître dans la thérapeutique antimicrobienne.

Nous remercions chaleureusement le Docteur FRADKINE et les Laboratoires DIAMANT pour l'aide précieuse qu'il nous ont apporté dans ce travail.

REVUE GÉNÉRALE

A. SUR LES PÉNICILLINES

On va tenter dans ce premier chapitre de schématiser les analogies et les différences entre les pénicillines sur le plan physico-chimique, pharmacologique et bactériologique.

Précisons d'emblée que cette étude comparative se bornera à deux pénicillines classiques, la pénicilline G et la pénicilline V, et à deux pénicillines « nouvelles », la phénéthicilline et la méthicilline, les quatre seules largement utilisées et commercialisées en France à l'heure actuelle [15, 70, 74]. On sait, en effet, combien sont nombreuses les pénicillines isolées depuis la découverte de Fleming, tant dans le milieu de culture de la moisissure *Penicillium* (pénicillines G, F, F', K, O, X, V...) que par semi-synthèse (pénicillines « nouvelles », dont le nombre s'accroît sans cesse) et une limitation du sujet s'avère indispensable ici.

Nous donnons ci-dessous un tableau de correspondance entre les différents termes et synonymes utilisés pour désigner les quatre pénicillines étudiées ici, pour n'employer par la suite que la dénomination commune (en majuscules sur le tableau). Les publications mentionnent, en effet, trop souvent sans distinction, soit la dénomination commune, soit la dénomination chimique, soit encore un numéro d'expérimentation ou le nom d'une présentation commerciale.

— *PÉNICILLINE G (dénomination commune).*
Dénomination chimique : benzyl-pénicilline.
Dérivés et leurs noms commerciaux :
benzathine-pénicilline (EXTENCILLINE),
pénéthacilline (BRONCHOCILLINE),
phényracilline (ALFADRYL),
bénéthamine-pénicilline (BICLINOCILLINE)...

— *PÉNICILLINE V* ou *PHÉNOMYCILLINE (dénominations communes).*
Dénomination chimique: phénoxy-méthyl-pénicilline.
Nom commercial : ORACILLINE.

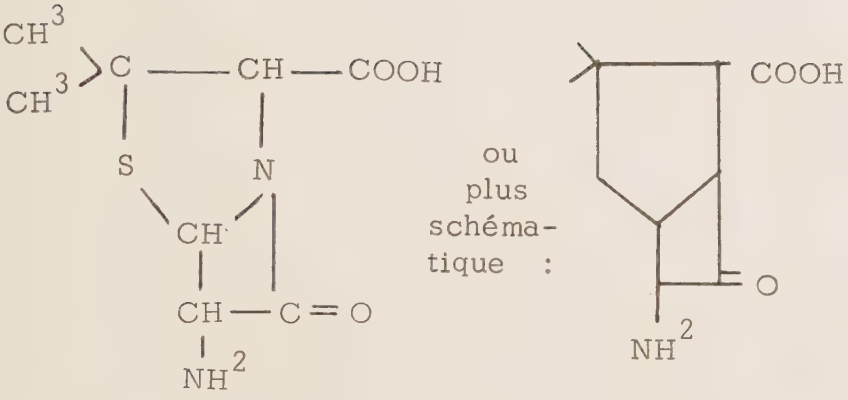
— *PHENÉTHICILLINE (dénomination commune).*
Dénomination chimique : phénoxy-éthyl-pénicilline.
Noms commerciaux :
BROXIL (G.-B.),
SYNCILLIN ou B.L.P. 152 (U.S.A.),
SYNTHÉCILLINE (France).

— *MÉTHICILLINE (dénomination commune).*
Dénomination chimique : 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline ou 2-6-diméthо-phényl-pénicilline.
Noms commerciaux :
CELBENIN ou B.R.L. 1241 (G.-B.),
STAPHCILLIN ou X 14-97 (U.S.A.),
FLABELLINE, PENISTAPH (France).

On va maintenant mettre en relief les caractères différentiels les plus intéressants de ces quatre pénicillines.

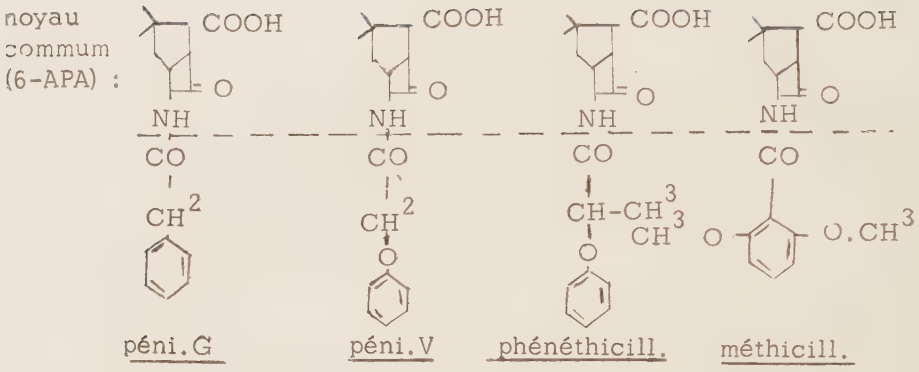
I. Caractères physico-chimiques

Toutes les pénicillines ont un noyau chimique (ou « nucleus ») commun, l'acide 6-amino-pénicillanique ou 6-APA, récemment isolé à l'état pur par Batchelor et ses collaborateurs [4, 34], dont la formule développée est la suivante :



Nous en retiendrons la fonction acide organique (—COOH), le pont β lactame (—CO—N=) et la fonction amine en position 6 ($—NH_2$) sur laquelle viendra se greffer une chaîne latérale plus ou moins longue, à copule acide, conférant sa personnalité à la pénicilline correspondante. De cette similitude nucléaire, il s'ensuit des propriétés organoleptiques sensiblement identiques. Ce sont toutes des poudres cristallines blanches, inodores, assez peu hydrosolubles à l'état acide, beaucoup plus à l'état de sel alcalin ou alcalino-terreux. Ces derniers, très maniables, constituent d'ailleurs leur forme officinale et commerciale car ils sont de plus très stables à l'état sec et neutres en solution [15, 43, 70, 74] (à ce sujet il faut noter que toutes les propriétés des pénicillines se rapportent en fait non pas à leur forme acide libre, mais à leur forme neutralisée).

Par contre, à l'opposé de leurs propriétés organoleptiques, la stabilité de leurs solutions vis-à-vis de la chaleur, des pH acides et de l'enzyme pénicillinase, varie notablement d'une pénicilline à l'autre, car elle est en relation directe avec leur chaîne latérale. Le tableau ci-dessous montre les différences de structure de ces chaînes :



Ce qui frappe d'abord ici, c'est l'analogie entre la chaîne de la pénicilline V et celle de la phénéthicilline, puisqu'elles ne diffèrent que par un groupement méthyl (—CH_3). Puis c'est la moindre longueur de la chaîne de la méthicilline par rapport aux trois autres, puisque le deuxième maillon carboné a disparu. Enfin c'est la présence dans tous les cas d'un noyau benzénique en bout de chaîne, certaines pénicillines en étant dépourvues, comme la pénicilline K par exemple.

Stabilité des solutions vis-à-vis de la chaleur

Même à la température ordinaire, les solutions de pénicilline s'altèrent assez rapidement. On a, en effet, affaire à une substance organique très oxydable. Cependant, en solvant convenable, ce n'est qu'après plusieurs heures que la perte d'activité est notable. A cet égard, la pénicilline G se révèle la plus stable, suivie par la pénicilline V, la phénéthicilline et la méthicilline. Cette dernière est d'ailleurs nettement plus labile que les autres [16].

A 37°C, la stabilité est encore bonne pour les trois premières durant quelques heures. Enfin, aux températures plus élevées, la thermolabilité est marquée dans tous les cas. La présence de certains sels (phosphates, citrate) augmente-

rait cette stabilité, alors que d'autres (sels de métaux lourds, chlorure de sodium) la diminueraient [51, 74].

Par contre, au congélateur et en solvant convenable, les solutions des quatre pénicillines étudiées peuvent se conserver pendant plusieurs mois sans perte d'activité.

Stabilité des solutions vis-à-vis des pH acides

Vis-à-vis des pH acides forts (suc gastrique), on note deux comportements différents : d'un côté la pénicilline G et la méthicilline détruites rapidement, de l'autre la pénicilline V et la phénéthicilline remarquablement stables.

On explique cela par la présence de l'atome d'oxygène supplémentaire sur la chaîne latérale de ces deux dernières pénicillines. Notons qu'au laboratoire on prépare de préférence les solutions de pénicilline G en tampon phosphaté pH 6, le maximum de stabilité de cet antibiotique se situant entre les pH 6 et 6,5. Quant aux solutions de pénicilline V, elles se préparent en tampon pH 8 et celles de phénéthicilline et de méthicilline en eau distillée [25, 32, 54].

Stabilité des solutions en présence de pénicillinase

Cet enzyme redoutable, élaboré rappelons-le par certaines bactéries, notamment un certain nombre de staphylocoques pathogènes, hydrolyse, c'est-à-dire inactive, les pénicillines au niveau du pont β-lactame situé comme on l'a vu sur le noyau de la molécule. Or, soulignons dès maintenant un fait capital : alors que l'hydrolyse de la pénicilline G, de la pénicilline V et de la phénéthicilline est rapide et totale, celle de la méthicilline, par contre, est très lente et partielle, aux taux normalement élaborés par les bactéries productrices de pénicillinase.

Cette différence de comportement, qui s'explique aussi par une chaîne latérale de structure différente, aura un profond retentissement sur les propriétés bactériologiques des pénicillines étudiées. Nous y reviendrons en détail.

II. Caractères pharmacologiques

Nous allons passer brièvement en revue la voie d'administration et l'absorption, les taux sanguins obtenus, la diffusion, l'élimination, la toxicité et les effets secondaires.

Voie d'administration et absorption

L'administration d'un médicament par voie digestive étant étroitement liée à sa stabilité en milieu acide, la voie orale ne sera possible qu'avec la pénicilline V et la phénéthicilline; d'autre part, conformément à ce qu'on a vu plus haut, la voie parentérale sera seule utilisable avec la pénicilline G et la méthicilline. Par ailleurs, la voie rectale est très incertaine, étant donné la présence à ce niveau d'une abondante flore productrice de pénicillinase.

Le passage dans le sang est très rapide et un taux élevé est atteint en trente minutes environ par voie intramusculaire, en soixante minutes par voie digestive.

Taux sanguins

Retenons simplement que les taux sanguins obtenus avec la phénéthicilline après administration orale, sont deux à trois fois plus élevés qu'avec la pénicilline V [29]. D'autre part, la posologie réclame des doses plus importantes pour la méthicilline que pour la pénicilline G, car son activité antibactérienne est inférieure à poids égal.

Enfin, le sérum humain ne diminue pratiquement pas les effets de la méthicilline, à l'inverse de ce qu'on observe avec les trois autres pénicillines, une fraction de celles-ci formant avec les protéines du sérum des combinaisons temporairement inactives [16]. D'ailleurs il y a une relation étroite entre le poids moléculaire d'une pénicilline et son effet sérum [31].

Diffusion

Aucune des quatre pénicillines étudiées ne franchit la barrière hémoméningée, sauf en cas d'inflammation impor-

tante [16, 75]. Par ailleurs, les taux obtenus dans l'humeur aqueuse sont beaucoup plus importants que dans l'humeur vitrée après administration par voie générale [18]. Enfin, chez la femme enceinte sous pénicilline, le sang placentaire présenterait une pénicillinémie moitié moindre.

Elimination

L'élimination des pénicillines est essentiellement urinaire, par filtration et sécrétion tubulaire, mais de petites quantités se retrouvent aussi dans la bile, la sueur et les larmes [74] ; au cours de l'allaitement, 10 % de la pénicilline injectée à la mère se retrouvent dans le lait. Parallèlement à leur grande vitesse de diffusion, cette élimination est très rapide et même avec les pénicillines nouvelles il faut répéter fréquemment les doses. Ainsi s'expliquent les nombreuses formes « retard » proposées pour la pénicilline G. Rappelons qu'elles sont destinées à maintenir dans le sang de façon prolongée une concentration antibiotique efficace. Ce but est atteint à l'heure actuelle, soit en retardant la résorption tissulaire de l'antibiotique au point d'injection (combinaisons macromoléculaires peu solubles, type pénicillinate de procaïne ou bipénicillinate de diphényl-pipérazine), soit en freinant l'élimination urinaire (Benemide). Dans le cas de cette dernière substance, on n'a pas affaire d'ailleurs à une véritable association retard, puisqu'elle s'administre séparément, mais plutôt à un inhibiteur compétitif de l'élimination au niveau des tubuli rénaux.

Signalons enfin que les concentrations très élevées obtenues dans les urines peuvent se révéler intéressantes dans le traitement de certaines infections urinaires à germes inaccessibles par les concentrations plus faibles normalement réalisées dans le sang. C'est le cas de certaines souches d'*Escherichia coli* par exemple.

Toxicité et effets secondaires

Sur le plan de la toxicité et des effets secondaires, toutes

les pénicillines sont douées d'une innocuité remarquable, même en cas de posologie excessive; elles n'exposent notamment à aucun désordre intestinal ou hématologique, ce qui en fait vraiment l'antibiotique de base. Cependant, des accidents allergiques se manifestent parfois (poussées d'urticaire, dermatoses diverses ou réactions anaphylactiques graves), dont une des indications majeures est d'ailleurs, comme on le verra plus loin, l'administration de pénicillinase.

Ces accidents allergiques sont donc bien connus pour les pénicillines classiques et l'avènement des pénicillines nouvelles laissa un moment espérer une atténuation ou une disparition du pouvoir allergisant. Malheureusement, la méthicilline expose à des accidents du même ordre et présente même une allergie croisée avec les précédentes; et pourtant elle serait immunologiquement différente [16]. Il faut relater aussi deux cas d'intolérance à la méthicilline rapportés récemment [72], mais il s'agit là, semble-t-il, de cas exceptionnels.

III. Caractères bactériologiques

On va envisager successivement le mode d'action, le spectre, le processus de résistance et la sensibilité à la pénicillinase des quatre pénicillines étudiées ici.

On verra rapidement que sur le plan de la bactériologie pure, ces quatre pénicillines seraient très comparables si leur sensibilité à la pénicillinase ne présentait des différences notables, tout au moins en ce qui concerne la méthicilline; et, répétons-le, le regain considérable d'intérêt se manifestant à l'heure actuelle pour la pénicilline en général et l'idée même de notre travail, trouvent en fait ici leur seule raison d'être.

Auparavant, un bref rappel sur le processus d'action théorique de la molécule de pénicilline à l'échelle cellulaire n'est peut-être pas dépourvu d'intérêt.

Le mécanisme intime d'action de la pénicilline G sur la cellule bactérienne est encore assez mal connu. Cependant la majorité des auteurs admettent que la pénicilline agit en inhibant la synthèse de la membrane bactérienne, en venant tapisser électivement la surface des jeunes bactéries en voie de croissance. Une expérience très simple illustre cette théorie : les solutions de pénicilline, faites en réalité d'agrégats moléculaires, sont fluorescentes, c'est-à-dire émettent une lumière verte en milieu ultra-violet, à l'inverse précisément des suspensions aqueuses de cellules bactériennes. Or, si l'on ajoute de la pénicilline à une culture bactérienne en voie de croissance, la surface de chaque bactérie devient fluorescente ! On a constaté, d'autre part, avec de la pénicilline marquée, que l'antibiotique se fixe sur les germes sensibles à raison de dix molécules environ par germe [38, 39, 40].

Cette fixation de pénicilline à la surface des bactéries en voie de croissance s'effectuerait par un phénomène électrique, les molécules de pénicilline chargées négativement en solution, car ionisées, venant s'accoler à la membrane bactérienne chargée positivement. Cette dernière deviendrait alors incapable de concentrer l'acide glutamique du milieu ambiant (Gale) et présenterait de graves perturbations au niveau de son métabolisme ribo-nucléique (Macheboeuf et Gros) [52, 74]. Autrement dit, il y aurait inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, répétons-le.

Par contre, les bactéries sensibles ayant terminé leur croissance et possédant une membrane bactérienne complète, ne sont pratiquement pas affectées par la pénicilline. Quant aux germes gram-négatifs, ils seraient beaucoup moins influencés par cet antibiotique, car ils ont un pouvoir de synthèse beaucoup plus marqué; leur métabolisme serait donc comparativement moins perturbé par la pénicilline (Gale) [74]. De plus, ils seraient entourés d'une couche de lipo-protéines qui les protégerait contre cet antibiotique. Chez les souches productrices de pénicillinase appartenant aux espèces sensibles, l'enzyme est un facteur surajouté

venant bloquer le déclenchement du processus précédent. En effet, si l'on parvient à transformer des staphylocoques producteurs de pénicillinase en non-producteurs, par la chaleur par exemple, ou par un autre artifice physique, ils deviennent sensibles à la pénicilline [3, 5, 11, 21].

Enfin, les cellules jeunes de l'homme et des animaux supérieurs ne sont pas désorganisées par cet antibiotique car elles n'opèrent pas la synthèse de structures chimiques semblables.

Spectre

La pénicilline G est classiquement active sur toutes les bactéries gram-positives, sur certaines bactéries gram-négatives (Neisseriacées, Spirochétales, Anaérobies non telluriques) et sur quelques rares gros virus (Miyagawanelles) [70, 74].

Le spectre comparé des trois autres pénicillines, si l'on met à part les germes producteurs de pénicillinase, présente avec la pénicilline G des différences minimes essentiellement quantitatives. Ainsi la pénicilline V est légèrement supérieure à la pénicilline G vis-à-vis de *Corynebacterium diphteriae* et des streptocoques, et quatre fois moins active à l'égard des Neisseriacées [29]. La phénéthicilline est moins efficace que la pénicilline G à l'égard du streptocoque, du pneumocoque, de *Bacteridium anthracis* et de quelques autres germes. Ajoutons toutefois que cette infériorité est compensée par les remarquables concentrations sanguines obtenues.

Quant à la méthicilline, elle présente une très grande particularité. D'une part, elle manifeste, par rapport aux trois autres pénicillines étudiées, une activité nettement moindre sur le plan pondéral, notamment à l'égard des staphylocoques non producteurs de pénicillinase et de *Corynebacterium diphteriae*. D'autre part, pour la première fois dans l'histoire de la pénicilline, elle montre une activité remarquable sur les staphylocoques producteurs de pénicillinase. C'est la raison pour laquelle, en abordant le spectre

comparé des pénicillines, on a d'emblée séparé nettement ces deux aspects du problème, en mettant à part les germes producteurs de pénicillinase.

Mode d'action

Les quatre pénicillines étudiées présentent la remarquable propriété d'être bactéricides, c'est-à-dire non seulement d'arrêter la croissance du germe électivement sensible (ce qui est le propre des antibiotiques simplement bactériostatiques), mais de le tuer, propriété particulièrement précieuse chez un organisme défaillant, devenu incapable de parachever l'action d'un bactériostatique.

Mieux même, dans certains cas, notamment vis-à-vis des espèces pourvues d'un système autolytique bien actif tels que les staphylocoques, le pouvoir bactéricide se double d'un pouvoir bactériolytique, c'est-à-dire s'accompagne de la dissolution des cadavres bactériens [74]. Ce phénomène fut noté par Fleming dès le début de ses découvertes : les colonies de staphylocoques se développant sur le pourtour de la fameuse moisissure, manifestement en train de se lyser, devenaient « transparentes » [24].

Résistance

Chaque fois que l'on aborde le problème si complexe de la résistance bactérienne à un antibiotique, il faut bien distinguer d'une part l'insensibilité quasi-totale de certaines espèces bactériennes (résistance « naturelle ») ; d'autre part, au sein même des espèces réputées sensibles, l'insensibilité relative d'une ou plusieurs souches. Ce dernier caractère peut apparaître soit d'emblée (on parle alors aussi de résistance naturelle), soit à la suite d'une exposition plus ou moins prolongée à l'antibiotique : on avance alors le terme de résistance « acquise », provoquée ou induite, la plus préoccupante et la plus étudiée de toutes les formes de résistance.

Dans le cas particulier de la pénicillino-résistance, tout

ce qui précède est valable, mais deux points sont à retenir particulièrement au sujet de la résistance des espèces sensibles.

D'une part, en ce qui concerne la résistance « acquise » ou provoquée, il faut reconnaître et retenir que s'il est possible de la faire apparaître au laboratoire (par repiquages répétés *in vitro*), ce phénomène ne se produit pratiquement jamais *in vivo* en cours de traitement avec la pénicilline. On sait qu'il n'en est pas de même avec certains autres antibiotiques (streptomycine, novobiocine...).

D'autre part, dans le domaine du staphylocoque, bien connu pour ses nombreuses souches pénicillino-résistantes et les défaites successives qu'il a infligées à la pénicillinothérapie, on va s'efforcer d'expliquer l'accroissement spectaculaire de sa pénicillino-résistance « naturelle » depuis vingt ans et de montrer la grande originalité de cette bactérie à l'égard de cet antibiotique.

On sait maintenant que toutes les souches de staphylocoques résistantes ont le singulier privilège de produire de la pénicillinase, qu'elles le possédaient avant tout contact avec la pénicilline, sortes de mutants résistants préexistants, et que l'emploi de cet antibiotique, en éliminant peu à peu les souches sensibles, n'a fait que les démasquer !

Une seconde particularité de ce germe réside dans le fait que si l'on prend une souche sensible et si l'on parvient assez facilement *in vitro* (par repiquages répétés) à lui faire « acquérir » un certain degré de pénicillino-résistance, ce phénomène ne s'accompagne jamais, et ceci est capital, de l'apparition d'une pénicillinase dans son matériel enzymatique. Mieux, on note même simultanément une perte ou une atténuation du pouvoir pathogène [3, 70] (Rake, 1944; Spink, Ferris et Vivino, 1944; Blair, Carr et Buchanan, 1946). Ce fait primordial a été amplement démontré et contrôlé par un étiquettage rigoureux des souches de staphylocoques sur le plan sérologique, biochimique et lysotypique (Turpin, Pillet et coll.). Comme on le voit, en matière de résistance, le staphylocoque nous oblige à réviser

en quelque sorte toutes les notions classiques. Autrement dit, malgré sa capacité d'adaptation *in vitro*, un staphylocoque sensible ne devient jamais résistant *in vivo*. Ce qui a pu faire croire à cela c'est la survenue fréquente et insidieuse d'une surinfection par une souche productrice de pénicillinase, soit par sélection à partir d'une flore staphylococcique initiale hétérogène, soit par contamination exogène, ce qui est particulièrement fréquent en milieu hospitalier. En matière de staphylococcie on ne doit donc pas parler, si l'on veut être précis, d'une augmentation de la résistance de l'espèce à l'égard de la pénicilline depuis Fleming, mais de l'émergence de plus en plus grande de mutants résistants. Par ailleurs, il semble plus correct de distinguer d'emblée d'un côté les staphylocoques producteurs de pénicillinase, de l'autre les staphylocoques non producteurs de l'enzyme, plutôt que de continuer à parler de souches résistantes et de souches sensibles à la pénicilline. D'autant plus qu'en face d'une souche productrice de pénicillinase, il est difficile de dire avec précision, même au laboratoire, si la souche est sensible ou résistante (puisque l'action terminale de la pénicilline G dépend étroitement de la quantité d'enzyme produit par le germe traité et de sa vitesse d'élaboration, donc du nombre de germes en présence et de l'importance de l'inoculum). A plus forte raison, en clinique, on ne peut prévoir si la souche sera ou non accessible au traitement par les pénicillines classiques, puisque le résultat sera fonction de l'importance de l'infection et de la posologie mise en œuvre.

On saisit peut-être encore mieux maintenant l'importance et le considérable retentissement de la découverte de la méthicilline venant presque invalider en partie les données précédentes, puisqu'elle ne fait pratiquement plus de différence entre les staphylocoques producteurs de pénicillinase et les non-producteurs. La réalité est en fait un peu plus complexe et nous allons voir qu'il ne s'agit que de degrés différents de sensibilité à la pénicillinase staphylococcique.

Sensibilité à la pénicillinase

C'est dans le domaine de la sensibilité à la pénicillinase que se situent les différences bactériologiques essentielles entre les quatre pénicillines étudiées.

La pénicilline V présentait déjà un léger progrès à ce point de vue, par rapport à la pénicilline G, si vulnérable à ce redoutable enzyme bactérien ; la phénéthicilline marqua un nouveau pas en avant. Avec la méthicilline on tient enfin une pénicilline pratiquement indifférente à l'hydrolase bactérienne : cette propriété particulièrement précieuse lui permet de tuer les bactéries productrices de cette diastase avant que celles-ci n'aient le temps de l'élaborer en quantité suffisante pour l'inactiver. La méthicilline est, en effet, cent à deux cent fois moins sensible à la pénicillinase que les trois autres pénicillines, comme nous le montrerons dans nos travaux personnels.

Nous reviendrons dans la troisième partie de notre exposé sur les espoirs que l'on peut raisonnablement fonder quant à l'avenir de ce remarquable antibiotique nouveau.

Avant de terminer ce paragraphe, insistons cependant sur le fait que si la méthicilline vient constituer un nouvel atout majeur dans la lutte si préoccupante contre les staphylococcies rebelles, si polymorphes et si insidieuses, tout en conservant les remarquables critères d'atoxicité et de bactéricidie inhérents à la molécule de pénicilline, elle ne peut prétendre supplanter les autres pénicillines dans leurs autres domaines d'application et en particulier contre les staphylocoques non producteurs de pénicillinase.

Nous allons maintenant achever cette revue générale en nous attardant assez longuement sur un des facteurs faisant l'unité des pénicillines et intéressant à plusieurs titres : la pénicillinase.

B. SUR LA PÉNICILLINASE

La propriété de la pénicillinase la plus intéressante à analyser est sans conteste son mode d'action sur la

pénicilline et notamment son point d'impact sur cet édifice moléculaire. Or, à notre connaissance, l'inactivation de l'antibiotique s'effectue toujours selon le même schéma, quelle que soit l'origine de l'enzyme. C'est pourquoi, malgré l'existence de plusieurs pénicillinases, en particulier sur le plan de leur origine et de leurs caractères physico-chimiques, on peut continuer à parler de « la » pénicillinase.

Après un bref historique, nous considèrerons les diverses espèces productrices de l'enzyme, ses modes actuels de préparation et de purification, la nature de la réaction catalysée et sa cinétique. Puis nous exposerons les propriétés enzymatiques, physico-chimiques et immunologiques de cette diastase microbienne. Enfin nous développerons un problème d'actualité : le phénomène d'induction.

Historique

A peine un an après la purification et la mise au point définitive de la pénicilline G en vue de son utilisation thérapeutique par Florey, Abraham, Chain et Heatley d'Oxford, les mêmes Abraham et Chain annonçaient dans la revue anglaise « Nature » (1940) qu'ils avaient découvert le facteur responsable de l'inactivation bactérienne de la pénicilline. La bactérie en cause était une souche pénicillino-résistante d'*Escherichia coli*. Quant à la substance incriminée, elle reçut d'eux le nom de « pénicillinase », car elle présentait tous les critères d'un enzyme [2, 60] et agissait spécifiquement sur cet antibiotique.

Les diverses espèces productrices

Des travaux ultérieurs à la découverte princeps d'Abraham et Chain montrèrent que la pénicillinase pouvait en réalité être élaborée par de nombreuses espèces bactériennes gram-positives et gram-négatives, à des taux très variables d'ailleurs. Par contre, aucune trace de cet enzyme n'a été relevée chez les levures, les champignons, les protozoaires ou les cellules d'êtres plus élevés en organisation [60].

Parmi les bactéries gram positives, c'est au sein du genre *Bacillus* que se situent les souches les plus productrices connues; l'enzyme s'y trouve principalement sous forme exo ou extra-cellulaire, c'est-à-dire qu'il est libéré dans le milieu de culture et que sa production optimum est habituellement liée à la présence de pénicilline dans le milieu (pénicillinase adaptative). Ainsi *Bacillus cereus, B. subtilis, B. megatherium* constituent les principales sources industrielles de pénicillinase. Ensuite nous trouvons quelques souches de *Bacteridium anthracis, Listeria monocytogenes* et de nombreuses souches de *Micrococcus pyogenes var. aureus* (*Staphylococcus aureus*). Ces dernières sont les seules à poser, répétons-le, un grave problème thérapeutique étant donné leur importance en pathologie et l'inefficacité si fréquente de la chimiothérapie à leur égard. Chez ces dernières, d'ailleurs, par opposition aux germes du genre *Bacillus,* la pénicillinase élaborée reste généralement liée étroitement aux cellules bactériennes, c'est-à-dire qu'elle est endo ou intracellulaire [3]. C'est peut-être la raison pour laquelle la présence effective de l'enzyme chez les souches de staphylocoques pénicillino-résistantes ne fut reconnue que plusieurs années après la découverte initiale d'Abraham et Chain chez le colibacille.

Cependant des travaux récents (Eriksen et Hansen, 1954) [20] rapportent la production de pénicillinase extracellulaire et non plus endocellulaire chez huit souches de staphylocoque doré. Aussi est-ce le moment d'insister sur un point très important : même au sein d'une espèce bactérienne donnée, le caractère exo ou endocellulaire, la quantité totale d'enzyme formé et le degré auquel sa production peut être stimulée par la présence de pénicilline dans le milieu (son degré d'induction ou inducibilité), peuvent varier énormément d'une souche à l'autre [60]. Certains auteurs se demandent même si une souche fortement productrice n'est pas susceptible de perdre partiellement, par mutation génétique, son pouvoir d'élaborer l'enzyme [10].

Parmi les bactéries gram-négatives, les espèces productrices appartiennent surtout à la flore intestinale : *Escherichia coli, Fecalis alcaligenes* (*Achromobacter fecalis*), les anciens « Paracolibacilles » (*Aerobacter cloacae* et *Aerobacter aerogenes, Escherichia freundii* ou *Citrobacter, Arizona, Providencia*), *Pseudomonas aeruginosa, Shigella*. En outre quelques souches d'*Hemophilus influenzae* et d'*Actinomyces* élaborent aussi l'enzyme; ce dernier genre se situe d'ailleurs à la limite de la bactériologie et de la mycologie.

Chez les bactéries gram-négatives productrices, on considère généralement l'enzyme comme endocellulaire. Cela n'implique d'ailleurs pas que la diastase soit intégralement à l'intérieur même de la cellule bactérienne. En effet, certains auteurs pensent qu'on peut aussi envisager une fraction de l'enzyme solidement fixée à la périphérie de la cellule [60]. Mais, répétons-le, tout cela est très variable, non seulement d'une espèce à l'autre, mais d'une souche à l'autre.

Avant de passer aux modes de préparation de l'enzyme, voici quelques méthodes de détection de la pénicillinase chez les bactéries susceptibles d'en produire, c'est-à-dire chez les bactéries pénicillino-résistantes :

1° *La méthode de Fleming.*

On ensemence la bactérie à étudier en divers points d'une gélose pénicillinée (à 2 U.O. par ml). On porte la boîte de Pétri à l'étuve à 37°C pendant vingt-quatre heures puis on ensemence entre les zones de pousse un staphylocoque très sensible à la pénicilline G, donc incapable de croître ici. Si sa pousse n'est pas inhibée, on pourra donc conclure à la production de pénicillinase de la part de la bactérie étudiée [51].

2° *La méthode de Bondi et Dietz.*

C'est également une méthode de diffusion.

On coule en boîtes de Pétri de la gélose ensemencée au voisinage de 50°C avec un staphylocoque très sensible à la pénicilline G. Puis on dépose à la surface de cette gélose (en position Nord-Sud) deux cylindres de porcelaine type Heatley, préala-

blement remplis par capillarité d'une suspension de germe à étudier et de pénicilline G à 4 U.O. par ml, les positions Est et Ouest recevant chacune un cylindre témoin c'est-à-dire renfermant pénicilline G et bouillon stérile. On porte alors les boîtes à 37°C pendant vingt-quatre heures et, au sortir de l'étuve, on mesure le diamètre des zones d'inhibition obtenues.

Pour conclure à la présence de pénicillinase, il faudra que le diamètre d'inhibition obtenu avec les cylindres Nord-Sud soit nul ou nettement inférieur à celui des cylindres témoins. On aura ainsi la preuve indirecte que le germe présent dans le cylindre avec l'antibiotique a détruit ce dernier au moyen d'une pénicillinase [51].

3° *La méthode de Gotz* (d'après Haight).

On coule en boîtes de Pétri de la gélose ensemencée au voisinage de 45°C avec une souche de *Sarcina lutea* très sensible à la pénicilline G (C.M.I. récemment déterminée). Mais — et c'est là la première originalité de la méthode — on incorpore en outre, à une partie de la gélose en fusion, de la pénicilline G en quantités telles qu'une partie des boîtes renferme une concentration en antibiotique sub-inhibitrice pour la sarcine, une autre partie la concentration minima inhibitrice elle-même (C.M.I.), une troisième partie une concentration supérieure à la C.M.I.

On a ainsi :

— des boîtes ne contenant pas de pénicilline G;
— des boîtes contenant une concentration sub-inhibitrice de pénicilline ($\gamma <$ C.M.I.);
— des boîtes contenant la concentration minima inhibitrice de l'antibiotique ($\gamma =$ C.M.I.);
— des boîtes contenant une concentration supra-inhibitrice de l'antibiotique ($\gamma >$ C.M.I.).

On ensemence alors, à l'aide de l'anse de platine, sur chaque boîte et en dessinant une circonférence, d'une part la sarcine jaune, d'autre part deux germes témoins à savoir un staphylocoque producteur de pénicillinase et un staphylocoque non producteur. Puis on porte les boîtes à l'étuve à 37°C pendant vingt heures.

On conclura à la production de pénicillinase de la part du germe étudié si l'on note l'apparition, sur les boîtes pour lesquelles $\gamma =$ C.M.I. et sur lesquelles la sarcine n'a par conséquent pas poussé, de colonies de sarcine sur le pourtour de la pousse circulaire du germe étudié (pénicillino-résistant par définition). Les autres boîtes servent de témoins de la C.M.I. Quant aux boîtes

sans pénicilline G elles servent à déceler un éventuel antagonisme entre la sarcine et le germe étudié; ce qui arrive parfois, notamment lorsque les souches testées appartiennent à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ou au genre *Actinomyces*, germes pouvant libérer un antibiotique (pyocyanine, actinomycine). Enfin, la souche de staphylocoque pénicillinase-négative sert de témoin de la sarcine car elle réagit de la même façon.

La production de pénicillinase sera d'autant plus intense que le nombre de colonies de sarcine apparues sur les boîtes-tests sera plus élevé.

Cette méthode est donc assez complexe, mais cadre le problème de façon satisfaisante [9].

4° *La méthode de Welsch* (1949).

On ensemence la bactérie à étudier en divers points d'une gélose pénicillinée à 2 U.O. par ml. On porte à l'étuve à 37°C. Après une pousse suffisante on ensemence au voisinage des colonies bien individualisées un germe très sensible à la pénicilline et ne pouvant donc pousser ici. On conclura à la production de pénicillinase de la part du germe étudié si, au voisinage immédiat de ses colonies, le germe-test parvient à pousser [74].

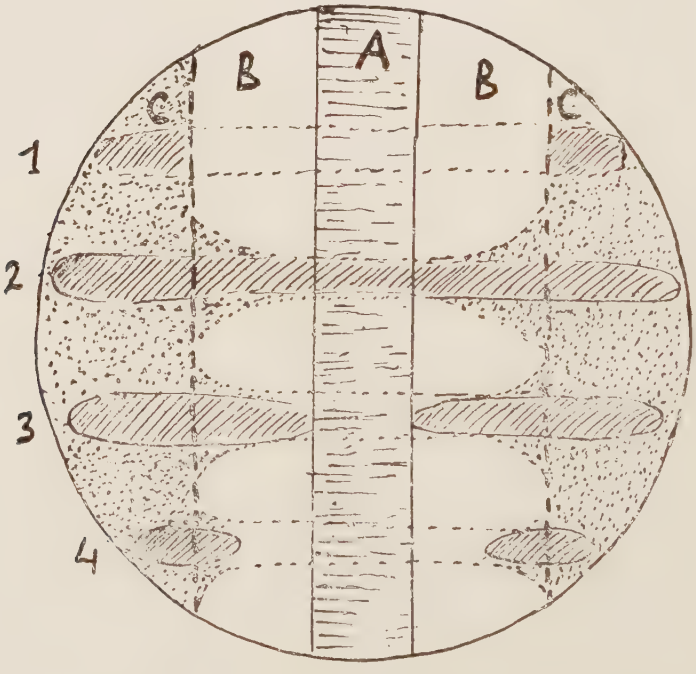
Cette méthode se rapproche donc de la méthode de Fleming. Toutefois, comme le fait remarquer Welsch, il peut arriver que le germe étudié élabore en outre un antibiotique venant inhiber secondairement la pousse éventuelle du germe-test et faire conclure à tort à la non-sécrétion de pénicillinase. C'est notamment le cas, comme on l'a vu à la méthode précédente, de certains *Actinomyces* et de certains *Pseudomonas*. D'où l'intérêt du test de Gotz, qui a le mérite de prévoir cette éventualité.

5° *La méthode de A. G. Innes* (1960).

L'auteur applique sa méthode aux staphylocoques, mais on verra qu'on peut l'étendre à d'autres germes.

On coule en boîtes de Pétri de la gélose ensemencée vers 45-50°C avec le staphylocoque Oxford standard en bouillon de vingt-quatre heures (à raison de 2 ml pour 100 ml de gélose). On laisse refroidir. Dans chaque boîte on pratique alors stérilement dans la gélose (avec un scalpel stérile et près de la

flamme) un sillon large de 1 cm et traversant toute la boîte. Puis on le comble par de la gélose fondue, pénicillinée à 10 U.O. par ml. On laisse refroidir. Les boîtes rigoureusement sèches en surface, sont ensuite ensemencées avec les cultures en bouillon des staphylocoques à tester (cultures de 6 à 10 heures). On doit procéder de la façon suivante : pour chaque staphylocoque à tester on pratique à l'aide d'un écouvillon stérile, une strie perpendiculaire au sillon central et séparée de la suivante par un intervalle de 2 cm. On peut faire de la sorte jusqu'à cinq stries par boîte, c'est-à-dire ensemencer jusqu'à cinq souches. Les boîtes sont alors mises à l'étuve à 37°C. On lit après dix-huit heures: le staphylocoque Oxford standard (coulé avec la gélose) poussera partout sauf au voisinage du sillon central (présentant 10 U.O. de pénicilline par ml); et la limite de sa zone de pousse sera parallèle au sillon car l'antibiotique diffuse de part et d'autre de ce dernier avec la même vitesse. Mais si un des germes étudiés produit de la pénicillinase il y aura d'une part empiètement du staphylocoque Oxford en forme de flèche dirigée vers le sillon central et de chaque côté, d'autre part pousse du staphylocoque étudié à l'intérieur même de la zone de diffusion de la pénicilline G. Et même, dans le cas d'un staphylocoque fortement producteur de pénicillinase, on notera une pousse à l'intérieur du sillon central :



Zone A = sillon central gélosé à 10 U.O. de pénicilline/ml.
Zone B = zone de diffusion de la pénicilline.
Zone C = zone de pousse du staphylocoque Oxford standard où l'antibiotique n'a pas diffusé.
Strie 1 = staphylocoque non producteur de pénicillinase.
Strie 2 = staphylocoque fortement producteur de pénicillinase.
Strie 3 = staphylocoque modérément producteur.
Strie 4 = staphylocoque faiblement producteur.

Cette méthode simple et élégante permet de focaliser, d'amplifier de façon spectaculaire les différences même minimes de production de pénicillinase existant entre diverses souches productrices et de mettre en évidence de très faibles quantités d'enzyme ayant pu, pour cette raison, passer inaperçues par les méthodes de détection usuelles [37].

On a donc, avec ces cinq techniques, un éventail suffisant de méthodes pour entreprendre chez un germe donné la mise en évidence d'une production de pénicillinase.

Modes de préparation et de purification de la pénicillinase

Soulignons dès maintenant que la purification complète de la pénicillinase sur le plan bactériologique, c'est-à-dire sa stérilisation, est un des obstacles majeurs de l'industrie de la pénicillinase à l'heure actuelle, car il est très difficile d'éliminer rigoureusement tous les germes qui ont donné naissance à cet enzyme, d'autant plus qu'on a affaire à une substance protéique thermolabile interdisant d'emblée la stérilisation par la chaleur. Ce dernier n'est en effet pas autre chose qu'un extrait purifié de culture microbienne. De sorte que certains procédés de stérilisation sont tenus secrets ou nécessitent un matériel et des techniques très spécialisés.

Nous allons exposer en détail quelques-unes des plus récentes méthodes de préparation de la pénicillinase.

Auparavant, une définition de la pénicillinase constitutive et adaptative est peut-être nécessaire. La pénicillinase constitutive fait partie de façon permanente de l'équipement enzymatique de la bactérie, est inscrite dans son génotype, avant tout contact avec la pénicilline, substrat correspondant fortuitement à cet enzyme. Au contraire, la pénicillinase « adaptative » n'apparaît que transitoirement sous l'influence du milieu, par une variation phénotypique, et disparaît pratiquement dès que le milieu ne renferme plus de pénicilline.

1° *La méthode de M. R. Pollock* (1957).

— Principe [58] :

On pratique une culture de *Bacillus cereus* sur hydrolysat de caséine et citrate pendant une nuit, puis on filtre. Le filtrat de culture peut servir, sans aucun traitement, de source de pénicillinase stable et de titre élevé, convenant notamment à l'inactivation de la pénicilline dans les tests de stérilité, dans les hémocultures, etc...

— Matériel et technique [58] :

Les souches de *Bacillus cereus* choisies sont la souche 5/B (NCTC 9946[3]) et la souche 569/H (NCTC 9945[4]), souches mutantes productrices d'exopénicillinase constitutive. D'après l'auteur, la première fournirait des titres moins élevés en enzyme mais serait préférable car plus stable génétiquement.

Le milieu de culture aura la composition suivante : hydrolysat de caséine Difco (qualité technique) (10 g), phosphate monopotassique (2,72 g), citrate de sodium (5,88 g) dissous dans 200 ml d'eau. Puis on ajoute de la soude concentrée jusqu'à pH 7,2 et de l'eau en quantité suffisante pour faire 1 litre de solution. On porte à l'autoclave. Alors 100 ml d'une solution renfermant 0,41 g de sulfate de magnésium, 7 OH_2, et 1 ml d'une solution

à 0,16 % de sulfate ferreux ammoniacal, 6 OH_2, préalablement autoclavés, sont ajoutés à la solution précédente par petites portions.

On procède à l'ensemencement du milieu de culture avec des spores lavées de *Bacillus cereus* ou des cellules provenant d'une culture sur gélose inclinée. Puis le milieu est maintenu entre 18 et 37°C jusqu'à ce qu'on obtienne une pousse visible. Sur quoi la culture est mise à agiter en flacon conique et en aérobiose pendant 16 heures environ à 35-37°C (une aération intense est indispensable pour obtenir un rendement optimum, comme on le verra aussi dans la méthode de H. Cassagne). Alors on élimine toutes les cellules bactériennes du milieu par centrifugation pour ne conserver que le liquide surnageant très riche en pénicillinase.

Si l'on ne désire pas une préparation de pénicillinase stérile, le liquide surnageant sera simplement additonné de quelques cristaux de 8-hydroxy-quinoléine. Dans le cas contraire, le surnageat sera stérilisé par filtration à travers un filtre en membrane Oxoid. Malheureusement on enregistre alors une perte d'activité de l'enzyme allant jusqu'à 20 % par suite de l'adsorption de la pénicillinase sur le filtre. En effet, c'est maintenant un phénomène bien connu, le verre frité ou les filtres Seitz adsorbent la plus grande partie de l'enzyme (notamment si la préparation a été obtenue sur hydrolysat de caséine) et sont par conséquent pratiquement inutilisables pour la stérilisation de la pénicillinase dans l'industrie. La filtration sur membrane Oxoid utilisée ici donne un filtrat stérile contenant encore 2 000 à 10 000 unités Pollock par ml, ce qui constitue un titre élevé. L'unité de pénicillinase, selon Pollock, est « la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de pénicilline G par heure à 37°C et à pH 7 », conditions dans lesquelles l'enzyme est saturé de substrat; cela équivaut en pratique à une concentration en pénicilline G un peu supérieure à 1 000 unités par ml. Et un dixième de ml du filtrat précédent serait capable d'inactiver dans ces conditions de 1 million à 5 millions d'unités de pénicilline G par heure.

Le filtrat stérile devra être gardé au réfrigérateur où il conservera son activité pendant plusieurs semaines; il pourra aussi être lyophilisé et conservé en ampoules scellées pendant plusieurs mois.

L'inactivation progressive de la pénicillinase en solution s'explique en premier lieu par l'action d'une protéinase présente dans le milieu de culture dans certains cas et réalisant donc, fait assez rare, une hydrolyse enzymatique d'un enzyme, en second lieu par son adsorption sur les surfaces solides, en particulier le verre, pour lequel la pénicillinase a une exceptionnelle

affinité, répétons-le. Cependant, l'addition de citrate au milieu de culture permet d'éliminer l'ion calcium essentiel à la formation et à l'action de la protéinase bactérienne. Quant à l'adsorption sur le verre, on peut y remédier dans une certaine mesure en incorporant 1 % de gélatine à la solution de pénicillinase. Toutefois Pollock fait remarquer que sa méthode de préparation permet l'obtention de si hauts titres initiaux de pénicillinase que la perte proportionnelle d'activité est faible. En outre, on doit tenir compte du fait que la constante d'affinité de Michaelis pour la pénicilline G de la part de l'enzyme est approximativement de 20 U/ml, quand on calcule la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse d'un taux donné de pénicilline dans un temps donné. Ainsi, dès que la concentration de pénicilline tombe au-dessous de 1 000 U/ml, l'enzyme cesse d'être saturé de substrat et le taux d'hydrolyse commence à décroître notablement. C'est pourquoi il est recommandé d'ajouter au moins dix fois le taux de pénicillinase nécessaire théoriquement pour que l'enzyme soit saturé de substrat. Ainsi on sera sûr que la réaction sera complète dans le temps requis.

2° *La méthode de N. Citri* (1960).

— Principe [14] :

Là aussi l'auteur préconise l'utilisation de *Bacillus cereus* parmi les germes producteurs de pénicillinase. Dans un premier temps l'enzyme obtenu est sélectivement adsorbé en pH acide par diverses substances minérales (poudre de verre, fibres de verre...) ou organiques (cellulose ou autres polysaccharides). Puis la pénicillinase est éluée dans un volume minimum d'électrolyte alcalin et concentrée dans le vide.

— Matériel et technique [14] :

La souche de *Bacillus cereus* choisie est comme précédemment une souche mutante productrice d'exopénicillinase constitutive telle que la souche 5/B (NCTC 9946[3]) par exemple.

Le milieu de culture aura une composition identique également à celui proposé dans la méthode précédente : hydrolysat acide de caséine à 1 % (190 g), phosphate monopotassique (57 g), citrate de sodium (114 g). Puis le milieu est complété à 19 litres avec de l'eau distillée, placé dans un appareil à fermentation en verre et le pH ajusté à 7,2 avec une solution de soude. Le fer-

fermenteur et le milieu de culture sont alors stérilisés à l'autoclave sous une pression de 1 atmosphère environ (15 livres par pouce carré) pendant 90 minutes puis refroidis.

Le milieu de culture, additionné d'un litre de solution stérile de sulfate de magnésium, 7 OH_2, à 4 pour mille, est ensemencé avec 500 ml d'une culture en flacon agité de *Bacillus cereus* souche 5/B. Cette dernière est obtenue en ensemençant du bouillon peptoné (peptone 1 %, extrait de viande 0,3 %, chlorure de sodium 0,2 %) avec des spores de la souche mutante (culture de départ). Le milieu de culture ensemencé est alors mis à incuber à 35°C environ et aéré simultanément par de l'air stérile pendant 8 à 10 heures.

Au sortir de l'étuve, le milieu de culture est traité par 320 g de kieselguhr à pH 5 et filtré à travers un filtre de kieselguhr. Le magma resté sur le filtre ainsi que ce dernier ont retenu plus de 90 % de la pénicillinase. Ils sont lavés à l'eau distillée puis élués avec 1,5 litre d'une solution alcaline renfermant 58,5 g de chlorure de sodium et 27 g de citrate de sodium. Les 200 premiers millilitres d'éluat et les 150 derniers sont rejetés. Le reste de l'éluat est dialysé à trois reprises contre du tampon phosphaté 0,001 M (pH 7), concentré dans le vide à environ 10 % de son volume et filtré à travers un filtre en verre fritté pour bactériologie saturé au préalable d'enzyme par des lavages répétés avec des solutions diluées de pénicillinase. Le filtrat est à son tour dialysé stérilement contre le tampon phosphaté précédent puis réparti aseptiquement par fractions de 1 million d'unités en ampoules de 2 ml et enfin lyophilisé.

La pénicillinase lyophilisée obtenue ne présente aucune toxicité pour la souris et le lapin. Elle est apyrogène pour ces derniers et s'avère pleinement efficace sur la pénicilline G injectée [illegible].

3° *La méthode de F. W. Bowman et S. Holdowsky* (1960).

Principe (10) :

Des spores de *Bacillus cereus* sont ensemencées sur bouillon au trypticase déshydraté additionné de citrate de sodium et stérilisé. Le milieu de culture est ensuite centrifugé, stérilisé par filtration et mis en ampoules stockées au congélateur. On peut obtenir un titre plus élevé en enzyme aux dépens de la stérilité en adsorbant la pénicillinase du milieu de culture sur alumine. On élue par le tampon phosphate, on dialyse et enfin on lyophilise.

— Matériel et technique [10] :

La souche de *Bacillus cereus* utilisée ici est, comme dans les deux méthodes précédentes, la souche mutante 5/B (NCTC 9946[3]) productrice d'exopénicillinase constitutive.

Pour obtenir les spores, la souche cultivée initialement en milieu liquide au thioglycollate, est repiquée sur gélose inclinée au trypticase où elle sporule spontanément. Les spores sont ensemencées sur bouillon au trypticase déshydraté à 2 % (Difco) additionné de 0,6 % de citrate de sodium et préalablement stérilisé à l'autoclave sous une pression d'une atmosphère environ pendant quinze minutes; ajoutons que le bouillon est réparti en flacons de 100 ml avant stérilisation et ajusté à pH 7-7,2. Les flacons ensemencés sont mis à agiter doucement pendant 16 à 18 heures sur un agitateur mécanique et maintenus simultanément à la température de 25-30°C. Puis les cultures sont immédiatement centrifugées à 4 000 t./mn pendant quinze minutes. Une seconde centrifugation est quelquefois nécessaire pour éliminer suffisamment les cellules et les débris cellulaires. Le surnageat (à pH 8-8,2) contenant la pénicillinase est alors stérilisé par filtration à travers un filtre de verre (Millipore Corp. Bedford, Mass.), mis en ampoules et stocké au congélateur. Enfin le titre de la pénicillinase est déterminé.

Une préparation de l'enzyme partiellement purifiée et de titre plus élevé peut être obtenue par adsorption de la pénicillinase sur alumine à 10 %, élution avec du tampon phosphate 1,5 M (pH 7), dialyse, lyophilisation, reprise par l'eau distillée et finalement stérilisation par filtration à travers un filtre de verre identique au précédent.

Toutefois, par ce procédé, on constate une perte considérable de produit et le titre final est cinq fois plus faible que celui escompté. On l'impute surtout à la dialyse (Woodruff et Foster) : il se produirait une transformation enzyme-coenzyme irréversible. Notons enfin que F. W. Bowman et S. Holdowsky proposent une méthode de contrôle du titre de la pénicillinase basée sur la définition de l'unité Lévy de pénicillinase (« quantité de pénicillinase inactivante 59,3 U.O. de pénicilline G par heure à 25°C et à pH 7, la concentration de pénicilline étant suffisante pour que le taux de la réaction reste toujours d'ordre zéro »). De plus, la pénicilline titrée sera sous forme de sel alcalin et on opèrera en tampon phosphaté.

Avant d'exposer les méthodes de préparation de la pénicillinase du bacille subtil et du staphylocoque doré, signalons que Baudet et Hagemann (1954) [5] ont proposé

d'extraire la pénicillinase du *Bacillus cereus* dans un grand état de pureté à partir d'un précipité acétonique de l'enzyme. La purification était réalisée par des séparations successives avec le sulfate d'ammonium, puis échange d'ions.

4° *La méthode de H. Cassagne* (1961).

— Principe [13] :

Une culture de *Bacillus subtilis* est ensemencée en bouillon glucosé fortement aéré (flacons de Fernbach). Après huit à dix jours d'étuve à 37°C, le milieu de culture est neutralisé, puis centrifugé et filtré sur bougie Chamberland L^3. Enfin le liquide de filtration est titré et mis en ampoules.

— Matériel et technique [13] :

Dans des flacons de Fernbach de 2 litres contenant 500 ml de bouillon glucosé à 2 pour mille sérile, on introduit 2 ml d'une culture de 24 heures de *Bacillus subtilis*. L'auteur recommande des flacons de ce type ainsi que du bouillon glucosé car l'aération et la richesse du milieu conditionnent un rendement optimum en pénicillinase. Puis on porte à l'étuve à 37°C pendant 8 à 10 jours (la production d'enzyme est maximum entre le 8e et le 10e jour de culture). Au bout de ce temps, le milieu est neutralisé par de la lessive de soude diluée, puis centrifugé pour éliminer les corps microbiens et filtré sur bougie Chamberland L^3. Enfin, le filtrat est titré et réparti stérilement en ampoules de 1 ml.

— Titrage de la pénicillinase :

H. Cassagne donne ensuite deux méthodes de titrage de la pénicillinase utilisées à l'Institut Pasteur. Nous croyons intéressant de les exposer en détail.

Le titre de la pénicillinase est exprimé par le nombre d'unités de pénicilline G inactivées par 0,05 ml de filtrat de culture de bacille subtil (cf. plus haut) dans 5 ml de milieu de culture. Rappelons que la pénicillinase fournie par l'Institut Pasteur titre entre 15 et 20 000 unités ainsi définies.

a) Méthode des dilutions :

C'est une méthode en tubes où l'on oppose une dose fixe de pénicillinase à des doses croissantes de pénicilline G.

Dans une série de tubes à hémolyse on distribue 5 ml d'eau peptonée à 20 pour mille (glucosée à 2 pour mille) et une quantité de pénicilline croissant de 10 000 à 20 000 unités Oxford. Puis on ajoute dans chaque tube 0,05 ml de filtrat de culture de bacille subtil (cf. plus haut), c'est-à-dire une dose fixe de pénicillinase. Enfin, on ensemence chaque tube avec 0,05 ml d'une culture de 24 heures de staphylocoque doré souche Londres NRRL 6571, diluée à 10^{-2} et on porte à l'étuve 24 heures.

Le titre de la pénicillinase étudiée correspond au nombre d'unités de pénicilline contenues dans le dernier tube où pousse le staphylocoque. Par ailleurs, on fera quelques tubes-témoins sans pénicillinase contenant 0,02 et 0,01 unité de pénicilline G.

b) Méthode des boîtes :

C'est une méthode de diffusion.

On coule en boîtes de Pétri de la gélose pénicillinée, on ensemence du staphylocoque en surface et on place sur chaque boîte cinq cylindres type Heatley remplis au préalable par capillarité de la pénicillinase à titrer. Après vingt-quatre heures d'étuve on mesure le diamètre de la pousse du staphylocoque Oxford autour de chaque cylindre, la quantité de pénicilline présente dans la gélose ne permettant pas au staphylocoque de pousser ailleurs.

Les boîtes de Pétri reçoivent chacune 20 ml de gélose nutritive à 15 pour mille à laquelle on ajoute juste avant de couler, 2 U.O. de pénicilline G (soit 0,1 U.O./ml). La pénicillinase à étudier sera introduite dans les cylindres aux dilutions suivantes : 1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20. Il en sera de même avec la pénicillinase étalon.

5° *La méthode de L. Vaczi et J. Uri* (1954).

— Principe [71] :

On ensemence une souche de *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus* (*Staphylococcus aureus*) fortement résistante à la pénicilline G sur bouillon de cheval en flacons de Kolle. On porte à l'étuve pendant vingt-quatre heures, on centrifuge. La pénicillinase des souches productrices étant généralement endocellulaire chez le staphylocoque, on s'attache ensuite à recueillir non plus le surnageat comme

dans les méthodes précédentes, mais les corps bactériens eux-mêmes. Pour cela on reprend le culot de centrifugation par du sérum physiologique. Puis on traite successivement la suspension obtenue par de l'acétone et de l'éther en alternant avec des centrifugations. Enfin la masse résiduelle est séchée sous vide, finement pulvérisée, titrée et stockée au frigidaire. On obtient donc une pénicillinase brute.

— Matériel et technique [71] :

On choisit une souche de staphylocoque fortement productrice de pénicillinase. Les auteurs utilisent une souche résistant *in vitro* à 500 unités de pénicilline G par millilitre. On l'ensemence sur bouillon de cheval en flacons de Kolle, selon la méthode de Gilson et Parker. On porte à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. On reprend la masse microbienne par du sérum physiologique et on centrifuge. Le culot est alors extrait par trois lavages avec du sérum physiologique glacé. On traite par l'acétone à — 20°C dans la proportion de 1 pour 7. On porte le mélange à — 20°C pendant 2 heures, on centrifuge et on décante le surnageat. On répète cela à trois reprises. On traite alors par l'éther à — 20°C, on maintient 1 heure à — 20°C et on centrifuge. On sèche rapidement sous vide la masse bactérienne résiduelle et la poudre jaune obtenue est broyée dans un mortier d'agate stérile. Enfin la pénicillinase brute ainsi obtenue est stockée au réfrigérateur.

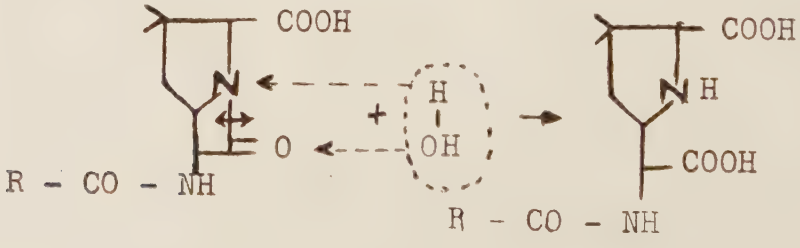
Nature de la réaction catalysée par la pénicillinase

La nature exacte de la réaction catalysée par la pénicillinase est un domaine d'approche difficile et les données actuelles sont encore assez schématiques.

Divers travaux furent d'abord effectués avec des préparations relativement brutes et par surcroît d'origine différente, d'où l'impossibilité dans la majorité des cas de caractériser de façon définitive le produit terminal de l'inactivation [60]. Foster, dès 1945, observa que si l'on faisait agir de la pénicillinase sur la pénicilline G en présence de bicarbonate, il y avait libération de gaz carbonique, ce qui signait indirectement l'apparition d'un acide dans le milieu, mais il ne poussa pas plus loin ses investigations

[26, 42]. Mais ce n'est qu'une étude récente sur la pénicillinase de *Bacillus cereus* qui a permis d'établir de façon définitive l'apparition d'un deuxième groupement acide organique (—COOH) à la fin de la réaction pénicilline-pénicillinase. On a même pu, par des titrages électrométriques, localiser ce nouveau groupement acide (de pK 4,7) sur la molécule de pénicilline inactivée : il se situe au voisinage du groupement amine (—NH_2) de l'acide 6-amino-pénicillanique [60] et le bi-acide formé, complètement inactif au point de vue antibiotique, a reçu le nom d' « acide pénicilloïque » [44, 65]. Une des preuves en faveur de la formation de ce bi-acide réside dans l'identité rigoureuse entre le corps résultant de l'action de la pénicillinase sur la 2-pentenyl-pénicilline et l'acide 2-pentenyl-pénicilloïque. De même, la réaction quantitative avec l'iode du corps obtenu par action de la pénicillinase sur la pénicilline G est absolument superposable à la réaction quantitative obtenue avec l'acide pénicilloïque lui-même [60].

La possibilité d'autres schémas d'inactivation enzymatique de la pénicilline n'est toutefois pas exclue, car il est des préparations inactivant la pénicilline G qui n'ont pu encore être analysées à fond [60]. Cependant cette éventualité est assez mince et il est raisonnable de penser que la majorité, si ce n'est la totalité, des préparations rapportées comme « pénicillinases » doivent leurs propriétés enzymatiques à une lactamase-pénicilline, catalysant l'hydrolyse des pénicillines en « acide pénicilloïque », dans une réaction comparable schématiquement (quoique non superposable [55]) à l'hydrolyse chimique de ce groupe d'antibiotiques par les alcalis dilués :



Selon le rapport de 1961 de la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, on doit ranger l'enzyme « pénicillinase » dans le groupe des « amido-hydrolases agissant sur une amide cyclique ».

Cinétique de la réaction catalysée par la pénicillinase

L'hydrolyse des pénicillines par la pénicillinase est une réaction enzymatique d'ordre zéro : « le taux d'inactivation enregistré est indépendant de la concentration du milieu en pénicilline et directement proportionnel à la concentration en pénicillinase » [55].

Cette réaction très brutale et très rapide se poursuit à vitesse constante jusqu'à ce que presque toute la pénicilline présente soit détruite. Cela montre d'une part que l'enzyme a une grande affinité pour son substrat, d'autre part que le produit d'hydrolyse a peu d'effet inhibiteur sur la réaction [60].

Dans une étude analytique détaillée de l'action de la pénicillinase de *Bacillus subtilis,* Banfield a montré que l'enzyme suit strictement la cinétique de Michaelis-Menten dans laquelle :

$$-V't = s + Km \log (s) + c$$

sur une vaste gamme de concentrations du substrat initial [60]. W. Rothe, cependant, utilisant aussi une préparation de *Bacillus subtilis,* a établi que la cinétique d'ordre zéro, maintenue pendant la plupart de la réaction, est précédée d'une période de six minutes où la réaction est monomoléculaire, car correspondant à une phase où l'on a adsorption irréversible du substrat sur l'enzyme [60].

Propriétés enzymatiques de la pénicillinase; inhibiteurs et activateurs; applications pratiques.

Sur le plan enzymatique proprement dit, l'activité de la pénicillinase est étroitement liée au pH du milieu et à la température.

Tout d'abord le pH a une grande importance. Ainsi la plupart des préparations de pénicillinase issues du genre

Bacillus (*B. cereus, B. subtilis, B. megatherium*) montrent une activité optimum entre pH 6 et pH 6,5 pour la benzyl-pénicilline, la phénoxy-méthyl-pénicilline et la phénoxy-éthyl-pénicilline; pour la 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline, la zone de pH optimum est encore plus étroite, puisqu'elle se situe entre pH 6,2 et pH 6,4. Des optima légèrement plus hauts sont rapportés pour la pénicillinase extraite de certains bacilles gram-négatifs [60]. Notons enfin que l'allure générale des courbes d'activité de ces différentes préparations en fonction du pH, varie considérablement d'une espèce productrice à l'autre [60].

La température intervient également. L'optimum thermique de cet enzyme se situe au voisinage de 37°C. Le coefficient température (Q^{10}) pour l'exopénicillinase de *Bacillus cereus* et *B. subtilis* est bas (jamais supérieur à 1,56) même aux températures peu élevées. Il décroît ensuite au-dessus de 40°C, où une appréciable inactivation peut survenir. Dans une étude précise concernant l'effet de la température sur l'activité d'une préparation purifiée d'exo-pénicillinase de *Bacillus cereus,* souche 569/H, Abraham et Newton ont calculé que l'énergie d'activation nécessaire pour hydrolyser la benzyl-pénicilline était de 5,3 ± 0,3 kcal/mole [60]. Cette valeur exceptionnellement basse est compatible, d'après ces auteurs, avec le taux de turn-over particulièrement haut de l'enzyme.

Sur le plan de la spécificité du substrat, aucun composé autre que le noyau des pénicillines (c'est-à-dire l'acide 6-amino-pénicillanique) n'a encore été trouvé sensible à l'action de la pénicillinase. Ainsi, même vis-à-vis de composés très voisins tels que la déthio-benzyl-pénicilline (pénicilline G privée de son atome de soufre nucléaire) ou de la N-phényl-acétyl L-cystéinyl D-valine (tripeptide très voisin de la benzyl-pénicilline), la pénicillinase est sans effet. Ce fait souligne encore à quel extraordinaire hasard on doit l'existence de cette diastase dans l'équipement enzymatique de certaines bactéries. Par ailleurs, le taux d'hydrolyse varie légèrement selon la chaîne latérale. Ainsi il est de 1,25 pour la phénoxy-méthyl-pénicilline si l'on

prend la valeur de 1 pour la benzyl-pénicilline. Et, fait curieux, l'acide 6-amino-pénicillanique, sur lequel porte essentiellement l'action de la pénicillinase, est hydrolysé plus lentement que les pénicillines classiques. Par contre on a vu le phénomène inverse avec la 2-6-diméthoxy-benzamido-pénicilline, nouvelle pénicilline. En outre, la constante de Michaelis (Km) est très basse avec la benzyl-pénicilline et varie légèrement selon la source de pénicillinase utilisée. Toutes les valeurs rapportées jusqu'à présent se situent entre 2×10^{-4}M et $4{,}8 \times 10^{-5}$M. Il est vrai qu'elles se limitent encore au genre *Bacillus*.

Inhibiteurs de la pénicillinase

Ce problème, que nous reprendrons dans nos travaux personnels, a toujours suscité beaucoup d'intérêt chez les spécialistes. En effet, si l'on parvenait à bloquer l'action ou la production de l'enzyme chez les bactéries productrices, on abolirait théoriquement du même coup leur pénicillino-résistance. On conçoit les difficultés de l'entreprise, car vouloir « empoisonner » un catalyseur à l'échelle cellulaire, ou le détourner de sa mission première, est beaucoup plus audacieux qu'à l'échelle de la chimie industrielle. Cela est d'autant plus vrai que l'enzyme à atteindre est souvent enfermé à l'intérieur même des cellules. Nous allons voir la multiplicité et l'ingéniosité des tentatives effectuées dans cette direction.

Tout d'abord des inhibiteurs chimiques brutaux, tels que les fluorures, peuvent être utilisés en association avec une brusque élévation de température par exemple pour bloquer instantanément et définitivement la réaction pénicilline-pénicillinase [55]. Mais là n'est pas généralement le véritable but poursuivi, car on a souvent affaire ici à des corps très toxiques. Les chercheurs préférèrent prospecter des substances qui seraient éventuellement applicables *in vivo*, c'est-à-dire dépourvues de toxicité, agissant à doses très

faibles et sans effet inhibiteur sur les pénicillines elles-mêmes.

Les premiers essais portèrent sur les divers sels métalliques en solution utilisés à des doses infra-bactériostatiques. Ainsi Henry et Housewright (1947) [34] mirent en évidence l'intérêt de l'ion ferreux Fe^{++}, suscitant une inhibition de la réaction pénicilline-pénicillinase (mesurée par la méthode manométrique) de l'ordre de 95 %, à la concentration très faible de 50 mcg/ml. De même, l'ion calcium Ca^{++} à la dose de 25 mcg/ml provoquait une inhibition de la réaction de l'ordre de 65 %. Ces résultats furent obtenus avec la pénicillinase de *Bacillus cereus*. Rothe montra d'autre part que la pénicillinase de *Bacillus subtilis* subissait également une inhibition par les sels de calcium 10^{-3}M, de l'ordre de 50 %. Bondi et Dietz (1948), essayant d'inhiber directement la production de pénicillinase chez la bactérie elle-même, obtinrent des résultats encourageants avec l'acide iodacétique et l'azide de sodium vis-à-vis des staphylocoques producteurs. Par contre, fait curieux, le bacille cereus (souche 569) n'est pas influencé par ces deux substances [60]. Ce qui met encore en relief l'importance de la notion d'origine, comme nous en ferons également la constatation à propos des propriétés physico-chimiques et immunologiques de l'enzyme.

En 1950, Behrens et Garrison [7] procédèrent à l'étude systématique de toutes les substances présentant une analogie structurale avec la pénicilline G, dans l'espoir de trouver un inhibiteur compétitif de l'antibiotique qui serait attaqué préférentiellement par la pénicillinase. L'idée, assez séduisante a priori, s'avèra peu fructueuse étant donné le très haut degré de spécificité du substrat. Toutefois, ils reconnurent des qualités inhibitrices non négligeables au 2-benzyl-imidazole et à l'acide benzyl-pénicillinique d'une part, au chlorure de D. L. pénicillamine d'autre part. Les deux premiers s'avérèrent intéressants dans les tests d'action de la pénicillinase sur la pénicilline *in vitro*, qu'ils inhibaient respectivement dans la proportion de 74 % et

de 26 %, le second dans les cultures de germes pénicillino-résistants additionnées de pénicilline. Dans le même ordre d'idées, Vaczi et Uri [71] expliquent l'effet inhibiteur relatif de la xylocaïne en milieu acide par une analogie structurale de ce composé avec la molécule de pénicilline.

Plus récemment (1960), Carr a fait une étude comparative *in vitro* de l'inhibition obtenue avec diverses substances, notamment le sérum antipénicillinase préparé chez le lapin [12]. Ce dernier corps représente, en effet, a priori, l'inhibiteur le plus spécifique de la pénicillinase (en effet, comme nous le verrons plus loin, cet enzyme, de nature protéique, est doué de propriétés antigéniques). Cependant le composé qui s'avèra le plus intéressant fut le salicylate (à la concentration de $6{,}7 \times 10^{-1}$M), suivi par le sérum antipénicillinase (au 1/113e), le benzoate et le para-amino-benzoate (aux mêmes concentrations que le salicylate). Les taux d'inhibition obtenus furent respectivement de 61 %, 51 %, 31 % et 16 %. Notons que l'action inhibitrice du benzoate de sodium avait été signalée dès 1946 par Reid, Felton et Pitroff. Quant à l'association du sérum antipénicillinase avec chacun des sels, elle se montra dénuée d'intérêt, manifestant même parfois un antagonisme. En outre, la tentative d'inhiber la pénicillinase par divers sérums humains issus de malades atteints d'infections à staphylocoques fortement pénicillino-résistants (donc susceptibles de contenir de l'antipénicillinase d'origine humaine), se solda par un échec. Cela peut s'expliquer par le fait que la pénicillinase est faiblement antigénique chez l'homme, comme nous le verrons plus loin, et par l'absence ou tout au moins la faiblesse des réactions immunologiques croisées entre la pénicillinase staphylococcique et la pénicillinase de *Bacillus cereus* qui fut précisément au centre de ces travaux. Enfin, signalons que le procédé de mesure utilisé au cours de cette étude fut la méthode iodométrique modifiée [12].

Un autre travail récent (1960) mérite d'être rapporté pour son originalité. Brunner, Kraushaar et Prohaska, de

l'Ecole autrichienne, ont en effet montré le grand intérêt de certaines substances anioniques à surface active dans l'inhibition de la pénicillinase [10 *bis*]. Ainsi, le tridécyl-2-sulfate de sodium et le dodécyl-benzène-sulfonate de sodium (préalablement purifiés et utilisés en bouillon à la dilution très faible de 0,01 %) inhibent la pénicillinase des staphylocoques producteurs dans des proportions telles que la sensibilité à la pénicilline G d'une souche de staphylocoque initialement à 250 U.O. fut ramenée à des valeurs de l'ordre de 0,07 à 0,15 U.O./ml, c'est-à-dire à des valeurs comparables à celles des souches sensibles. L'activité de surface de ces substances oscille entre 25,8 et 50,2 dynes/cm. Fait curieux, les anions dont l'activité de surface est la plus élevée, tels que le déhydrocholate de sodium (qui atteint 50,1 dynes/cm), ne sont pas forcément les plus puissants inhibiteurs. Malheureusement l'addition de sérum dans les tubes de la réaction diminue notablement l'action inhibitrice ainsi que l'activité de surface. Ce qui semblerait limiter d'éventuelles applications de ce qui précède au traitement des affections cutanées.

Outre l'abaissement de la tension superficielle, un second agent physique, la chaleur, peut jouer dans une certaine mesure le rôle d'un inhibiteur de la pénicillinase. Ainsi Bondi, Kornblum et Phalle d'une part (1953), Fairbrother, Parker et Eaton d'autre part (1954), ont montré que la culture de staphylocoques producteurs de pénicillinase à la température de 44°C tendait à les transformer en variants pénicillino-sensibles, par suite de la perte du pouvoir d'élaborer l'enzyme [3, 11, 21].

Enfin, certaines substances à groupement thiol (—SH), comme l'acide thioglycollique ou la cystéine, sont réputées inhibitrices pour la pénicillinase [13, 77].

Dans le domaine des activateurs de cet enzyme, par contre, les données sont assez restreintes d'autant plus qu'il est souvent difficile de dire s'il y a véritablement activation de l'enzyme ou inhibition de la pénicilline. De plus, jusqu'à présent, rien n'a pu faire penser à la

nécessité d'un co-enzyme ou d'un quelconque autre type d'activateur qui permettrait à cette diastase de manifester une activité maximum [60].

Applications pratiques de la pénicillinase

C'est essentiellement dans trois domaines que la pénicillinase trouve des applications pratiques : au laboratoire de bactériologie, en thérapeutique et dans l'industrie pharmaceutique.

Au laboratoire de bactériologie, c'est maintenant un geste classique depuis les travaux de Harper, Dowling et Hirsh, Sureau, Chabbert, Monnier, ... d'ajouter quelques gouttes de pénicillinase dans un échantillon de sang, un liquide pleural, un liquide céphalo-rachidien ... mis en culture, avant de les porter à l'étuve, s'ils proviennent de malades sous pénicilline ou si l'on manque de renseignements cliniques. Cela facilitera ou même conditionnera peut-être l'isolement d'un germe éventuel.

En thérapeutique, c'est dans le domaine de l'allergie à la pénicilline que la pénicillinase a maintenant sa place. Il est d'ailleurs assez paradoxal que cet enzyme, ennemi occulte redoutable du clinicien au cours de traitements antibiotiques, soit devenu un auxiliaire possible du médecin. Cela découle de la très large diffusion de la pénicilline en thérapeutique et, corrélativement, de l'apparition chez certains sujets à terrain allergique, de réactions graves, voire mortelles, après une ou plusieurs administrations de cet antibiotique. Un rapport américain récent, peut-être un peu alarmiste, estime que les allergies à la pénicilline peuvent apparaître chez 0,2 à 16 % des malades traités par cet antibiotique. Elles surviennent surtout après administration parentérale de l'antibiotique, mais également après une prise orale, une instillation, une inhalation, un aérosol ... ou même une simple application de pommade. La durée et la gravité de la réaction sont pratiquement impossibles à prévoir. C'est Becker, en 1956, qui songea le premier à

utiliser chez l'homme cet antidote naturel hautement spécifique de l'allergène « pénicilline ». Citons ensuite Zimmermann, puis Ungen et Nemuth. En France, Huriez et coll. [35] ont fait une étude détaillée du rôle de la pénicillinase dans ce domaine, insistant notamment sur la rapidité d'action de cette substance si elle est administrée précocement et à doses convenables par voie intramusculaire. La voie intraveineuse serait à réserver au choc anaphylactique grave, avec la recommandation de délayer de préférence la pénicillinase injectée dans le sérum du malade.

En fait, la pénicillinase purifiée injectable (ex. Neutrapen) est plutôt considérée maintenant comme un adjuvant précieux des antihistaminiques et des corticoïdes, que l'on réserve aux cas graves. En effet, d'une part, elle est incapable à elle seule de faire rétrocéder par exemple certaines allergies tissulaires, comme l'eczéma allergique; d'autre part, elle peut provoquer des cas d'intolérance parfois sérieux (Fisher [23], Hyman et Reisch [61]) et on la déconseille chez les tout-petits. Au surplus, elle persiste plusieurs jours dans l'organisme [6]. Elle devra cependant avoir sa place dans la trousse d'urgence du médecin, aux côtés des antihistaminiques et des corticoïdes notamment, car le problème de la responsabilité médico-légale du praticien en face des accidents graves de la pénicillinothérapie ne doit pas être méconnu. Un récent article de Leclercq rappelle les précautions à prendre en dehors d'une anamnèse soigneuse et les tests préalables à pratiquer (scratch-test, I.D.R.) pour éviter dans la mesure du possible la survenue de tels accidents.

Dans l'industrie pharmaceutique, enfin, on a surtout recours à la pénicillinase pour vérifier la stérilité des lots de pénicilline. On sait, en effet, que l'instabilité de cet antibiotique rend impossible sa stérilisation par les procédés habituels (chaleur, antiseptiques). D'où la nécessité d'une asepsie rigoureuse au cours de la fabrication, car il ne faut pas oublier que son spectre ne se limite qu'à certaines

bactéries; par ailleurs il faut se mettre à l'abri de tous les germes de souillure producteurs de pénicillinase, qui compromettraient alors toute la production de l'usine. Parmi les tests de contrôle terminal (test de puissance, test d'atoxicité, test d'apyrogénicité...), le test de stérilité est donc d'une particulière importance pour s'assurer non seulement de l'absence de germes pénicillino-résistants, mais aussi de bactéries pénicillino-sensibles qui se sont révélées capables, dans certaines conditions, de survivre au contact avec la pénicilline anhydre. Mais pour réaliser dans les meilleures conditions la détection d'une souillure bactérienne éventuelle, il faut s'assurer au préalable que le pouvoir bactériostatique de la préparation à tester est complètement annihilé, c'est-à-dire avoir recours à la pénicillinase [51]. Voilà le troisième usage de cet enzyme. Notons enfin qu'on peut aussi l'utiliser industriellement (ou pour la simple recherche) pour doser rapidement certains lots de pénicilline, en titrant par potentiométrie ou acidimétrie l'acidité apparue dans le milieu [43]. Quant à son rôle dans l'industrie fromagère [67], pour détruire la pénicilline dans le lait des vaches traitées par cet antibiotique, il mérite aussi d'être mentionné au passage.

Propriétés physico-chimiques de la pénicillinase

Sur le plan physico-chimique, les données actuelles sont assez schématiques par suite des difficultés rencontrées pour isoler la pénicillinase à l'état rigoureusement pur. On va voir à propos de la stabilité, les nombreuses divergences qui existent lorsque les préparations étudiées ne sont pas parfaitement purifiées. Puis nous exposerons les seules connaissances physico-chimiques vraiment valables dont on dispose à l'heure actuelle et qui se limitent encore au genre *Bacillus*.

Au point de vue stabilité vis-à-vis de la chaleur, rappelons tout d'abord qu'Abraham et Chain, lors de leur découverte de la pénicillinase (1940) [2], insistèrent sur la thermo-

labilité de cette substance, montrant qu'elle était détruite par un séjour de cinq minutes à 90°C; cela témoignait, en outre, de la nature enzymatique de ce corps. Tous les auteurs qui attachèrent ultérieurement leur nom à l'étude de la pénicillinase, soulignèrent aussi l'instabilité de ce corps en solution aux températures supérieures à 25-30°C. Ainsi la pénicillinase de *Bacillus cereus* en solution, stable pendant plusieurs heures à la température ordinaire entre pH 3 et pH 10, voit son pouvoir enzymatique réduit près de dix fois après une heure de séjour à 37°C [10], de 50 % après trente minutes à 60°C et de 100 % après quelques minutes à 100°C. Rappelons au passage que toute étude sur la thermostabilité de l'enzyme doit tenir compte de l'adsorption éventuelle sur les récipients de verre, sinon on s'expose à des résultats erronés. La pénicillinase de *Bacillus subtilis* serait stable également à la température ordinaire, mais résisterait à 100°C pendant vingt minutes selon les uns, alors qu'elle serait complètement inactivée après trente minutes à 50°C selon les autres. Quant aux formes desséchées et lyophilisées, par contre, elles manifestent une thermostabilité beaucoup plus grande. Ainsi, un mois de séjour à 48°C ne diminue que de moitié l'activité de la pénicillinase de *Bacillus cereus* [10].

Les constantes que nous allons maintenant exposer, se rapportant au genre *Bacillus*, sont les seules données vraiment objectives dont on dispose à l'heure actuelle, répétons-le. C'est le japonais Murao, suivi bientôt par Baudet et Hagemann, qui proclama le premier avoir isolé de la pénicillinase cristallisée à partir d'une culture de *Bacillus cereus*. Malheureusement les préparations de ces trois auteurs ne répondaient en fait à aucun critère d'homogénéité et ce n'est que plus tard que Pollock, travaillant toujours sur la pénicillinase de *B. cereus* (souches 5/B, 569 et 569/H), obtint des cristaux véritablement homogènes (électrophorétiquement et sur le plan de l'ultracentrifugation) après adsorption sur la poudre de verre et fractionnement par le sulfate d'ammonium et l'éthanol [59].

La figure 2 donne une idée de l'allure générale de ces cristaux, d'après une photographie de Pollock.

Fig. 2. — Représentation schématique
Cristaux d'exo-pénicillinase induite de Bacillus cereus
d'après une photographie de Pollock [59], grossissement 275 ×.

A partir de cette préparation, quinze fois plus active que celle de Baudet et Hagemann (ce qui était bien la preuve irréfutable d'une plus grande pureté), Pollock put établir avec certitude [42, 59, 60] pour la pénicillinase de *Bacillus cereus* : le poids moléculaire, la mobilité électrophorétique (en cm^2/sec. à pH 8,4), l'activité spécifique (nombre d'unités/mg d'azote moléculaire) et l'activité moléculaire (nombre de moles de pénicilline G hydrolysées par molécule d'enzyme en une minute à + 30°C et à pH 7), le pH optimum d'action et la courbe d'activité en fonction du pH, la constante de Michaelis (Km), la composition chimique

(teneur en cystéine et en méthionine), les caractères immunologiques différentiels, le taux d'inactivation par l'iode, le degré d'inactivation ou d'adsorption par la poudre de verre...

Le tableau qui va suivre groupe quelques-uns de ces résultats [42].

Données physico-chimiques su

	PÉN(CILLINASE PURIFIÉE DE BACILLUS CEREUS 5/B
Nature.	Exoenzyme constitutif
Poids moléculaire.	35 200
Activité spécifique (unités/mg d'azote).	$1{,}53 \times 10^{6}$
Mobilité électrophorétique. . . .	$3{,}48 \times 10^{-5}$
Activité moléculaire.	$1{,}48 \times 10^{5}$
pH optimum; courbe d'activité en fonction du pH.....	
Km (constante de Michaelis) en face de la pénicilline G....	$4{,}32 \times 10^{-5}$M
Immunologie.	Antipénicillinase distincte mais réactions croisées
% en cystéine.....	Indécelable
% en méthionine.....	4 restes/molécule
Inactivation par l'iode.....	Lente
Adsorption par le verre.....	Modérée

D'après ce tableau, on peut voir tout d'abord qu'aucune différence significative n'existe entre les pénicillinases purifiées préparées à partir de la souche 569 et de sa souche mutante 569/H. Il n'en est pas de même par contre dans le cas de la souche 5/B, qui diffère quantitativement des deux autres presqu'en tous points. A ce sujet, il est intéres-

sant de noter que, tandis que les activités spécifiques et les poids moléculaires des pénicillinases issues des souches 5/B et 569 diffèrent notablement, leurs activités moléculaires sont presque identiques [60]. D'où l'hypothèse que ces deux diastases seraient superposables si la première n'était grevée d'un peptide additionnel. D'autre part, la composition

pénicillinase de B. cereus [42]

PÉNICILLINASE PURIFIÉE DE BACILLUS CEREUS 569	PÉNICILLINASE PURIFIÉE DE BACILLUS CEREUS 569/H
Exoenzyme induit	Exoenzyme constitutif
31 500	30 800
2,02 / 10^6	1,95 / 10^6
1,70 / 10^5	1,65 / 10^5
1,60 × 10^5	1,53 × 10^5
6-6,5	6-6,5
Courbes superposables	
4,87 × 10^{-5}M	
Antipénicillinases identiques et réactions croisées avec la 5/B	
Trace possible	
1 reste/molécule	
Lente	Lente
Très importante	Très importante

en acides aminés de la pénicillinase 5/B est caractérisée par l'absence de cyst(é)ine, une forte proportion en leucine et isoleucine (0,97) et un taux élevé d'acides di-amino di-carboxyliques (rendant compte à eux seuls de près de 50 % de l'azote). En ce qui concerne les amino-acides des pénicillinases 569 et 569/H, on ne dispose que de chiffres

expérimentaux, mais s'avérant toutefois très voisins de la pénicillinase 5/B et se caractérisant par un taux de méthionine plus bas, de tyrosine légèrement plus bas et par la présence possible de deux restes de 1/2 cystine [60]. Cette richesse en acides aminés souligne au passage la nature protéique de cet enzyme, nous laissant déjà entrevoir le comportement immunologique de ce composé.

Un autre point très important, sur lequel il faut encore insister, est l'exceptionnelle affinité des pénicillinases issues des souches 569 et 569/H de *Bacillus cereus* pour les surfaces de verre, sur lesquelles elles s'adsorbent à pH neutre (même en solutions très diluées) et d'où elles peuvent être éluées par certains sels alcalins en solution concentrée, tels que le citrate de sodium et le chlorure de sodium (cf. plus haut, méthode de préparation de la pénicillinase de N. Citri). Autrement dit, il faudra éviter l'utilisation de récipients de verre si l'on veut procéder à des dosages précis concernant la pénicillinase de *Bacillus cereus* (au cours de nos travaux personnels nous utilisons des tubes en matière plastique suffisamment thermorésistants pour être autoclavés). Pollock propose d'incorporer 1 % de gélatine à la préparation de pénicillinase [58, 60]. En outre il faudra limiter au maximum les manipulations de pipettes de verre. Fait curieux, la pénicillinase de *Bacillus cereus* souche 5/B, bien qu'adsorbée par les filtres en verre fritté, ne l'est que très faiblement par les récipients de verre et les pipettes [10, 60]. Quant aux pénicillinases de *Bacillus subtilis* et du staphylocoque, elles auraient un comportement identique à la précédente : adsorption insignifiante par les surfaces de verre, nette adsorption par passage à travers les filtres en verre fritté ainsi que les filtres Seitz et les filtres Berkefeld [3, 10, 60]. Par contre, les membranes Gradocol sont sans effet dans ce domaine. Cette adsorption est d'ailleurs mise à profit dans l'industrie pour isoler et concentrer l'enzyme à partir de grandes quantités de milieu de culture comme on l'a vu pour la préparation de l'enzyme. Signalons enfin que les solutions de pénicillinase présentent

des propriétés optiques qui peuvent retenir l'attention pour certaines investigations relatives à ce corps [66].

A côté des trois pénicillinases du bacille cereus étudiées précédemment, c'est-à-dire issues respectivement des souches 5/B, 569 et 569/H, Pollock a décrit récemment une γ-pénicillinase, issue également de la souche 569, mais se caractérisant par son caractère endo-cellulaire. Elle resterait liée à la membrane cellulaire, même après désintégration des cellules bactériennes, alors que les trois autres pénicillinases issues de cette espèce sont essentiellement exo-cellulaires. Par ailleurs, la γ-pénicillinase se distinguerait par son absence de réactions croisées avec chacun des sérums antipénicillinase des trois précédentes et par son inactivation presque instantanée par les iodures. On a pensé qu'elle représenterait le précurseur des trois autres, mais le travail de Citri, qui a réussi à l'obtenir à partir de l'exo-pénicillinase par action de l'urée ou d'un alcalin, incite plutôt à la considérer comme un produit de dénaturation partielle de l'exo-pénicillinase, comportant peut-être des groupements phénoliques libres appartenant à des résidus de tyrosine, apparus par suite d'un début d'hydrolyse de la grosse molécule de pénicillinase [60].

Pour terminer, rappelons que sur le plan biochimique on ne croit pas à l'existence d'un groupement prosthétique chez cet enzyme, à l'inverse de ce qu'on observe généralement avec les autres substances enzymatiques [60].

Propriétés immunologiques de la pénicillinase

La pénicillinase est une substance protéique complexe, composée notamment de méthionine et de tyrosine. Il n'est donc pas surprenant que cet enzyme soit doué de propriétés antigéniques. Toutefois, son antigénicité naturelle chez l'homme est assez faible, puisqu'il est très difficile de la mettre en évidence au cours des infections à staphylocoques producteurs, à l'inverse de l'antistreptolysine par exemple. Par contre, l'antigénicité provoquée chez l'animal, par

injections répétées de fortes doses de pénicillinase, est assez intéressante, comme nous allons le voir.

En 1945, Perlstein et Liebmann [56, 57] inoculèrent des lapins avec de la pénicillinase (issue d'un bacille gram négatif non spécifié) et obtinrent du sérum de lapin anti-pénicillinase qui protégeait *in vitro* la pénicilline contre l'action de cet enzyme. En 1947, Housewright et Henry proclamèrent même qu'ils avaient obtenu chez des lapins préparés avec de la pénicillinase de *Bacillus cereus,* du sérum antipénicillinase capable de protéger la pénicilline *in vitro* non seulement contre la pénicillinase de ce dernier germe, mais contre celle d'une souche de staphylocoque doré. Ces deux auteurs conclurent alors à l'identité immunologique de ces deux enzymes d'origine différente [23]. On est aujourd'hui beaucoup plus réservé sur ce point, d'autant plus que des expériences récentes ont montré des différences immunologiques non seulement au sein même du genre *Bacillus,* entre les espèces *subtilis, megatherium* et *cereus,* mais même entre certaines souches de cette dernière [3, 60, 66]. Plus près de nous, Tacking et Markov (1955) immunisèrent de même des lapins et des cobayes, à la fois passivement et activement, ce qui leur permit de réaliser *in vivo* (et non plus *in vitro*) une protection de la pénicilline G contre la pénicillinase, c'est-à-dire de juguler à l'aide de la seule pénicilline G, des infections à germes habituellement résistants [49, 68]. Frank et Mc Guigan parvinrent de même, en associant pénicilline G et sérum antipénicillinase, à protéger des souris contre des septicémies à germes producteurs habituellement mortelles chez cet animal [28]. On se doit enfin de rapporter une intéressante étude qui vient d'être publiée dans ce domaine par Wick, Holmes et Boniece (1960) [76]. Ces auteurs montrent tout d'abord comment procéder pour immuniser des lapins.

Des rongeurs de 2 à 3 kg reçoivent chacun par voie sous-cutanée trois injections par semaine de 50 000 unités Schenley de pénicillinase de *Bacillus cereus* (« Neutrapen ») (une unité Schenley est la quantité de pénicillinase qui inactive 60 unités

de pénicilline G en une heure à la température ordinaire et à pH 7), cela pendant sept semaines. A la fin de la septième semaine, on leur fait une ultime injection de la même dose que les précédentes, mais par voie intra-péritonéale. La réponse en anticorps, bonne lorsque la pénicillinase injectée est en suspension dans l'eau, est meilleure lorsqu'on injecte en même temps l'adjuvant complet de Freund (Difco) [50]. Pour récolter l'anticorps, les lapins sont saignés par ponction cardiaque, deux semaines après la dernière injection. On abandonne le sang à la coagulation et le sérum est finalement recueilli par centrifugation. Ce dernier, ainsi que du sérum témoin, sont portés à 56°C pendant 30 minutes (pour les décomplémenter) et stockés à + 4°C.

Les auteurs montrent ensuite qu'en mettant en contact du sérum antipénicillinase précédent et de la pénicillinase « Neutrapen », ils obtiennent des précipités. Cependant, une méthode plus élégante de mise en évidence des anticorps consiste en un test d'inhibition de la réaction pénicilline-pénicillinase :

0,2 ml de sérum sont passés en série de 2 en 2 dans une série de 14 tubes à hémolyse renfermant chacun 0,2 ml de sérum physiologique (soit des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8..., 1/8.192). Puis chaque tube est additionné de 0,1 ml de solution de pénicillinase titrant 1 unité Schenley. Alors tous les tubes sont mis à incuber 1 heure à 37°C, de façon que l'anticorps se fixe sur la pénicillinase. Au bout de ce temps, on ajoute dans chaque tube 6,25 unités de benzyl-pénicilline sous le volume de 0,1 ml (soit un total de 0,4 ml dans chaque tube) et on abandonne le tubier pendant 1 heure à la température de la pièce, pour que la réaction pénicilline-pénicillinase soit complète. Puis 0,1 ml (soit 2 gouttes) de chaque tube sont déposés sur autant de disques de papier-filtre (pour antibiogramme) préalablement placés à raison de 4 par boîte, sur des boîtes de Pétri ensemencées avec un staphylocoque pénicillino-sensible (souche 3.055). Le titre du sérum-antipénicillinase est donné par la plus haute dilution de sérum donnant une zone d'inhibition du staphylocoque-témoin égale à celle produite par 1,5 unités de pénicilline G.

Grâce au test précédent, Wick et ses collaborateurs purent démontrer notamment que le sérum antipénicillinase obtenu

chez le lapin protégeait la pénicilline *in vitro* contre la pénicillinase du bacille *cereus,* mais aussi, fait très intéressant, contre celle du staphylocoque producteur (souche H 232). Cependant, vis-à-vis de cette dernière, le sérum antipénicillinase se révéla huit fois moins actif. Ces auteurs conclurent donc à une différence immunologique seulement partielle entre les deux pénicillinases précédentes, car *in vivo* le sérum antipénicillinase précédent potentialisa dans une certaine mesure la pénicilline G au cours d'infections expérimentales par un staphylocoque résistant (phage 80/81 de Blair) chez le lapin et la souris. On peut cependant présumer, avec Wick, Holmes et Boniece, que le sérum spécifique contre la pénicillinase staphylococcique aurait donné de meilleurs résultats. Toutefois, certains auteurs doutent de l'effet constant du sérum antipénicillinase même spécifique, contre les staphylocoques, se demandant comment une grosse molécule de globuline-anticorps pourrait pénétrer à l'intérieur des staphylocoques, seule condition de succès puisque la pénicillinase y est généralement intracellulaire. Il est certain qu'il ne faut pas être trop enthousiaste dans ses hypothèses, mais on peut être tout au moins optimiste, d'autant plus que chez les staphylocoques en voie de croissance la membrane n'est pas encore formée. De toutes façons, le dernier mot restera à l'expérimentateur.

Anticorps précipitants, anticorps neutralisants, degré d'affinité de l'anticorps pour l'enzyme, méthode d'immunisation, réactions immunologiques croisées, on le voit donc, chez l'animal, l'expérimentation a été multiple, variée et assez fructueuse. Par contre, chez l'homme, aucune tentative de cet ordre n'a encore été tentée, à notre connaissance. On sait simplement que l'injection de pénicillinase purifiée est généralement bien supportée, à part quelques exceptions [23, 34 *bis*, 61], et que l'antipénicillinase est pratiquement indécelable dans le sérum des sujets atteints de staphylococcies à germes résistants aux pénicillines classiques. De nombreuses raisons expliquent cette absence d'expéri-

mentation chez l'homme, notamment la difficulté de trouver dans le commerce de la pénicillinase staphylococcique vraiment stérile. Enfin, il faut reconnaître que cette question a perdu beaucoup de son intérêt en thérapeutique depuis l'avènement de nouvelles pénicillines, échappant dans une large mesure aux effets de la pénicillinase staphylococcique. Peut-être serons-nous contraints d'y revenir un jour.

Le phénomène d'induction de la pénicillinase chez les bactéries productrices

Ce phénomène est certainement une raison de plus de l'échec des pénicillines classiques en face des bactéries productrices de pénicillinase et notamment des staphylocoques. Nous allons voir d'ailleurs que ce phénomène intéresse également les pénicillines nouvelles.

On a constaté depuis longtemps que le simple fait de cultiver en présence de pénicilline G, certaines espèces bactériennes productrices de pénicillinase, déclenche rapidement chez ces microorganismes une production d'enzyme beaucoup plus forte. Il vient naturellement à l'esprit de confondre ce processus enzymogénétique avec le phénomène bien connu de résistance acquise. Mais si l'on examine le problème de plus près, on s'aperçoit qu'il est l'apanage exclusif des bactéries déjà reconnues productrices et qu'au surplus, même parmi ces dernières, il est loin d'être toujours de règle. Ce qui amène à le considérer tout au plus comme un des facteurs responsables du processus de résistance bactérienne, terme vague groupant de façon commode sous la même étiquette de nombreux phénomènes biochimiques généralement inconnus et certainement différents les uns des autres.

Nous allons essayer, à l'aide des données les plus récentes sur la question, d'exposer de façon détaillée ce processus enzymatique d'induction et de montrer son incidence sur la thérapeutique par les pénicillines aussi bien nouvelles que classiques.

Schématiquement, l'induction de la pénicillinase est un cas particulier d'adaptation enzymatique spécialement intéressant pour le bactériologiste et le clinicien. En effet, d'une part, il peut être déclenché par la mise en œuvre du traitement pénicilliné; d'autre part, il se traduit par une élaboration accrue d'un enzyme particulièrement peu souhaitable. On s'est donc aperçu que la molécule de pénicilline pouvait, dans certaines conditions, « catalyser » de façon souvent très importante le système de formation de la pénicillinase. Nous nous efforcerons d'en analyser le mécanisme intime qui paraît maintenant connu et de montrer qu'il se décompose en trois phases bien nettes et parfaitement séparées dans le temps. Auparavant, nous devons saluer au passage les biochimistes qui ont fortement contribué à nos progrès dans ce domaine, ayant trouvé avec l'exo-pénicillinase de *Bacillus cereus* un matériel enzymatique de choix, facile à obtenir et s'intégrant parfaitement dans le grand chapitre de la protéo-synthèse induite [33, 59], puisque cet enzyme est de nature protéique. Les travaux purement bactériologiques qui ont été réalisés simultanément ont eu le très grand mérite de montrer que, malgré certaines assertions premières, le phénomène d'induction pouvait s'appliquer aussi dans une large mesure aux staphylocoques producteurs de pénicillinase.

Les trois phases du phénomène d'induction, observables pendant la phase de croissance logarithmique d'une population microbienne productrice de pénicillinase, cultivée en présence de pénicilline, peuvent être décomposées ainsi :

a) une phase de silence, dite « d'interaction première », pendant laquelle la pénicilline (ou inducteur) pénètre à l'intérieur des cellules en voie de croissance et va se fixer sur un récepteur spécifique (ou centre d'induction). Elle dure deux minutes environ [33, 59] ;

b) une phase ascendante d'induction proprement dite, pendant laquelle la production de pénicillinase augmente peu à peu jusqu'à son taux maximum. Elle dure quinze minutes environ [33, 59] ;

c) une phase linéaire ou « active », où la production de pénicillinase se maintient à un taux constant, maximum lorsque la concentration de pénicilline introduite dans le milieu est au moins de 1 unité/ml (soit 0,6 mcg/ml) ; elle s'y maintient pendant plusieurs générations bactériennes, longtemps après que toute trace de pénicilline a disparu du milieu de culture; cela a fait parler d'une « irréversibilité » de l'induction de la pénicillinase, phénomène rare en matière d'adaptation enzymatique [33, 59].

On peut déjà tirer quelques conclusions pratiques de ce qui précède, applicables à la thérapeutique. Tout d'abord, pour aussi rapide qu'elle soit, l'induction de la pénicillinase n'est pas instantanée et l'on a, semble-t-il, tout intérêt à mettre en œuvre d'emblée, en face d'une souche reconnue productrice, une dose de charge, seule susceptible d'échapper à la pénicillinase initiale et d'atteindre la bactérie productrice avant que ne se produise le coup d'accélérateur enzymatique toujours possible. Il est évident que dans le cas de la méthicilline, on restera encore à l'abri de l'hydrolyse, mais il ne faut pas oublier que cet antibiotique peut déclencher l'induction au même titre que la pénicilline G. Notons cependant que la céphalosporine N (à noyau pénicillanique) catalyse beaucoup plus faiblement ce phénomène et permet d'espérer une amélioration possible dans ce domaine. La deuxième conclusion pratique, découlant de l'irréversibilité du phénomène, semblerait devoir conseiller après l'échec d'une thérapeutique par la pénicilline et par les autres antibiotiques, de reprendre le traitement pénicilliné quelque temps après et à dose supérieure; on aurait peut-être alors la chance de rencontrer un taux de pénicillinase redescendu à son taux initial, à condition toutefois que le nombre de germes n'ait pas augmenté dans des proportions trop importantes dans l'intervalle.

Il faut cependant remarquer l'inconstance du phénomène d'induction chez les bactéries productrices et les divers degrés possibles d'inducibilité, allant de moins du double à plus de mille fois le taux initial de pénicillinase. Ainsi,

parmi les espèces explorées (*B. cereus, M. pyogenes*) on a trouvé des souches ne présentant pas le processus d'induction, car elles sont peut-être dépourvues de récepteur cellulaire spécifique (ou centre d'induction). Par ailleurs, la vieille classification de Karstrom (1937), qui range les enzymes en « constitutifs » (inscrits dans le génotype, donc permanents) et « adaptatifs » (dus à une variation phénotypique sous l'influence du milieu, donc transitoires), si elle a le mérite de classer les idées, élève une barrière un peu trop stricte dans ce domaine. En effet, d'une part il existe des souches susceptibles d'induction, c'est-à-dire élaborant une pénicillinase « adaptative », dont le taux d'enzyme ne varie que très faiblement si on les cultive en présence de pénicilline et dont le taux initial n'était pas nul; c'est le cas par exemple de la souche 569/A de *Bacillus cereus*; d'autre part on connaît des souches mutantes (issues de souches « constitutives ») souvent très fortement productrices sans induction [59].

Il semble donc que l'on puisse parvenir à localiser avec précision dans la cellule les centres récepteurs de l'induction. On parviendra peut-être, d'autre part, à connaître la nature chimique exacte de tous les amino-acides initiaux et des précurseurs de l'enzyme entrant dans sa synthèse, conformément au schéma séduisant proposé par Pollock [59] :

On sait par exemple, grâce à l'utilisation de méthionine marquée par du soufre radio-actif, que cet acide aminé entre dans la synthèse de la pénicillinase dans la proportion de 10 % et que certains milieux de culture favorisent plus que d'autres cette synthèse [8, 30, 39].

Dans ces conditions, on pourra peut-être trouver le moyen chimique de bloquer ce mécanisme enzymatique d'induction et, qui sait, la production de pénicillinase elle-même. A ce sujet, certains inhibiteurs actuels de la pénicillinase interviendraient précisément en freinant l'induction [45] ; ce serait le cas notamment de l'azide de sodium, de l'oxime et du chloramphénicol.

TRAVAUX PERSONNELS

A. ÉTUDE COMPARATIVE DU COMPORTEMENT DES PÉNICILLINES CLASSIQUES ET NOUVELLES EN FACE DE LA PÉNICILLINASE

Il nous a d'abord paru intéressant d'entreprendre par une méthode purement bactériologique, une étude comparative du comportement de la pénicilline G, de la pénicilline V, de la phénéthicilline et de la méthicilline en face de la pénicillinase, afin de faire ressortir le plus possible les différences de sensibilité de ces quatre antibiotiques à l'égard de cette hydrolase bactérienne spécifique.

I. *Matériel, réactifs et principe de la méthode.*

La pénicillinase choisie est l'enzyme purifié extrait de *Bacillus cereus* et commercialisé par Schenlabs Pharmaceuticals, sous le nom de « Neutrapen » (*). Il eut été peut-être plus naturel de faire porter notre choix sur la pénicillinase du staphylocoque, la plus souvent rencontrée *in vivo*, mais il est très difficile à l'heure actuelle de se procurer ce dernier enzyme dans un état parfaitement stérile, c'est-à-dire parfaitement apte à l'expérimentation bactériologique.

La souche microbienne utilisée est *Sarcina lutea* (ATCC 9341), germe-test idéal pour notre expérimentation car don-

(*) Nous tenons spécialement à remercier les Laboratoires ROUSSEL pour l'amabilité avec laquelle ils nous ont procuré cette pénicillinase.

nant une pousse très homogène sur gélose et surtout se montrant d'une sensibilité comparable à l'égard des quatre pénicillines étudiées.

Matériel.

— tubes en matière plastique (autoclavable) de différents calibres;
— filtres-entonnoirs en verre fritté n° 44;
— flacons de Kitasato de 200 ml;
— bain-marie réglable;
— petits cônes de porcelaine perforés ou « fish spine beads », n° 3 (Géo Bray et C° Ltd), recommandés par l'O.M.S. pour le dosage de la pénicilline [45 *bis*]. Nous désignerons désormais ces petits cônes par le mot « perles ».

Réactifs.

— Pénicillinase purifiée « Neutrapen » sous forme lyophilisée, en flacons de 800 000 Unités Schenley (Schenlabs Pharmaceuticals).
— Pénicilline G sodique titrant 1620 U/mg (lot 8×49, Diamant).
— Pénicilline V titrant 1783 U/mg (lot 317, Theraplix).
— Phénéthicilline potassique (lot 9280, Diamant).
— Méthicilline (flacons de 0,50 g, Bristol).
— Tampon phosphaté pH 6 et pH 8.
— Eau distillée.

Principe de la méthode.

Schématiquement, notre travail a consisté, pour chacune des quatre pénicillines étudiées, à mettre en contact au bain-marie à 37°C, en tubes, des quantités constantes d'antibiotique et variables de pénicillinase, pendant un temps donné. Puis dans un second temps, nous nous sommes attachés à apprécier les quantités résiduelles d'antibiotiques en faisant diffuser, sur gélose ensemencée par *Sarcina lutea* (en boîtes de Pétri), le liquide des tubes à la sortie du bain-marie et

en mesurant le diamètre des zones d'inhibition obtenues. Quant aux « perles », elles furent particulièrement précieuses pour réaliser une diffusion uniforme et rationnelle de chaque pénicilline sur la gélose et facilitèrent grandement les manipulations.

Autrement dit nous avons procédé à quatre reprises et parallèlement à l'analyse fine d'une réaction pénicilline-pénicillinase par voie bactériologique.

Avant nous, cette réaction enzymatique avait été abondamment étudiée, qualitativement et quantitativement, par divers procédés notamment bactériologiques (Harper (1943), Duthie (1944), Smith (1945), Hunwicke (1946), Sureau et Boyer (1947), Gibian (1948), Monnier (1948)...) auxquels il était parfois reproché de ne pas toujours assurer complètement l'inactivation de l'enzyme résiduel à la fin de la réaction (au sortir du bain-marie) de telle sorte que ce dernier continuait à agir quelque temps sur son substrat, venant fausser d'autant les tests d'appréciation de la pénicilline résiduelle. Des méthodes chimiques plus rigoureuses peut-être mais plus délicates à manier, furent également mises au point (Henry et Housewright (1947); Wise et Twigg (1950); Penau, Philippe et Benoist (1951). Nous avons opté pour une méthode purement bactériologique en utilisant un moyen très simple d'éliminer la majeure partie de la pénicillinase résiduelle éventuelle, c'est-à-dire de stopper à coup sûr la réaction à la fin du temps théorique, au sortir du bain-marie. Il consiste à filtrer immédiatement à travers un verre fritté le contenu de tous les tubes de la réaction, en les retirant du bain-marie; nous avons vu, en effet, au chapitre des propriétés physico-chimiques de la pénicillinase, que cet enzyme était très fortement adsorbé par le verre fritté. Nous intercalons donc cette phase de filtration entre le bain-marie et l'étuve. De plus, nous n'utiliserons, aussi bien pour préparer les différentes dilutions de pénicillinase à partir des flacons de Neutrapen lyophilisée que pour mettre en contact au bain-marie l'antibiotique et l'enzyme, que des tubes en matière plastique. Nous avons

vu, en effet, spécialement pour la pénicillinase de *Bacillus cereus*, que le phénomène d'adsorption s'observait aussi sur les surfaces de verre (tubes de verre, pipettes...) et pouvait entraîner un abaissement du titre des solutions. Pour éliminer le léger risque d'adsorption sur les pipettes enfin, nous avons limité au maximum leur emploi.

Nous avons songé un moment à recourir à un inhibiteur chimique de la pénicillinase tel que le fluorure de sodium, pour stopper la réaction pénicilline-pénicillinase, mais nous avons dû y renoncer par suite des risques de bactériostase sur le germe-test (*Sarcina lutea*) et des risques d'altération des pénicillines elles-mêmes, si fragiles à l'égard des agents chimiques.

II. *Détail de l'expérimentation et résultats.*

1° *Tests préalables.*

Par divers essais préalables, il a fallu s'assurer de l'intérêt des filtres en verre fritté n° 44, c'est-à-dire de leur imperméabilité constante à l'égard des solutions de pénicillinase faiblement concentrées, de leur perméabilité totale aux solutions de pénicilline, enfin d'une amélioration sensible des résultats obtenus par la méthode bactériologique classique.

a) Test d'adsorption de la pénicillinase :

10 ml d'une solution aqueuse de pénicillinase à 4 Unités Schenley (une unité Schenley de pénicillinase est la quantité d'enzyme inactivant 1 unité de pénicilline G par minute ou 60 U/h, à 25°C et à pH 7) sont filtrés lentement, c'est-à-dire sans l'intervention du vide pour éviter les souillures, à travers un verre fritté stérile n° 44 et 1 ml du filtrat est mis en contact pendant 40 minutes à 37°C avec 1 ml de pénicilline G à 1,6 mcg/ml. Simultanément, dans un deuxième tube, on introduit 1 ml de la solution stock initiale de pénicillinase (à 4 U.S.) non filtrée et 1 ml de pénicilline G à 1,6 mcg/ml et on le porte également au bain-marie pendant 40 minutes. Enfin dans un troisième tube on introduit 1 ml de pénicilline G à 1,6 mcg/ml et 1 ml d'eau distillée et on le porte au bain-marie avec les deux précédents. Le second tube

servira de témoin de la pénicillinase, le troisième de témoin de la pénicilline.

Lorsque les 40 minutes de bain-marie sont écoulées, on plonge les trois tubes dans la glace fondante pendant quelques instants puis on dépose sur 2 ou 3 boîtes de Pétri (préalablement ensemencées avec Sarcina lutea*), quatre « perles » disposées en croix et remplies respectivement par capillarité des liquides suivants:*

— en position Nord = pénicillinase filtrée + pénicilline G.

— en position Sud = pénicillinase non filtrée + pénicilline G.

— en position Est et Ouest = pénicilline seule.

Puis on porte les boîtes à l'étuve pendant 24 heures. A la sortie de l'étuve les résultats sont les suivants :

— en position Nord = zone d'inhibition de 28 mm de diamètre.

— en position Sud = aucune inhibition.

— en Est et Ouest = zone d'inhibition de 28 mm de diamètre.

Les résultats sont donc probants : la pénicillinase filtrée est restée sur le filtre.

b) Test de perméabilité à la pénicilline.

On fait passer de la pénicilline à travers un filtre en verre fritté et on étudie ensuite le pouvoir d'inhibition du filtrat sur *Sarcina lutea* comparativement avec la même solution initiale de pénicilline non filtrée. Les diamètres obtenus sont rigoureusement identiques, ce qui suffit à prouver que le verre fritté est parfaitement perméable à la molécule de pénicilline.

c) Test d'efficacité de la méthode.

Avant d'entreprendre l'étude de la réaction pénicilline-pénicillinase additionnée de cette opération de filtration, il a fallu s'assurer que cela en valait la peine, c'est-à-dire entraînait un progrès intéressant par rapport à la méthode bactériologique classique. Nous avons donc pratiqué sur les différentes pénicillines, d'une part une réaction antibiotique-enzyme classique, d'autre part et simultanément la même réaction mais avec filtration. Les résultats furent assez encourageants comme nous allons le voir :

1. *Dans deux lots de huit tubes stériles en plastique contenant chacun 2 ml d'eau distillée stérile, on réalise une dilution en série à partir d'une solution de pénicillinase à 16 U.S./ml, de façon à obtenir, sous un volume de 0,2 ml, les dilutions finales suivantes:*

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
	8 U.	4 U.	2. U	1 U.	0,5 U.	0,25 U.	0,12 U.

(le tube VIII de chaque série ne reçoit pas de pénicillinase).

2. *Dans tous les tubes, y compris le huitième de chaque série (qui servira de témoin de la pénicilline), on introduit 2 ml de pénicilline G à 1,6 mcg/ml. On agite et on porte immédiatement au bain-marie à 37°C pendant 40 minutes. Les dilutions respectives de l'enzyme et de l'antibiotique deviennent :*

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Conc./ml de pénicillinase	4 U.	2 U.	1 U.	0,5	0,25	0,12	0,06	0
Conc./ml de pénicilline G	←			0,8 mcg				→

3. *Lorsque les 40 minutes sont écoulées, on sort tous les tubes du bain-marie et on les plonge dans la glace fondante. On procède alors à la filtration d'une des deux séries. Puis on prend le tube I de la série filtrée et le tube I de la série non filtrée et, à l'aide de « perles » stériles emplies par capillarité, on dépose une faible quantité (toujours constante) du liquide de chaque tube à la surface d'une boîte de Pétri gélosée ensemencée avec* Sarcina lutea, *de sorte qu'on ait le liquide filtré en position Nord, le liquide non filtré en position Sud; tandis qu'en Est et Ouest on dépose une perle chargée du liquide du tube VIII (pénicilline-témoin à 0,8 mcg/ml). On procède alors de la même façon pour tous les tubes suivants, puis on porte l'ensemble des boîtes de Pétri à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.*

4. *Au bout de vingt-quatre heures on retire les boîtes de l'étuve et on mesure les diamètres des zones d'inhibition obtenues sur la gélose (en millimètres). On obtient les résultats suivants :*

Série non filtrée

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Pénicilline résiduelle	0	0	0	0,20	0,45	0,65	0,80

Série filtrée

0	0	0,10	0,40	0,65	0,80	0,80

Nota. — Pour chaque test, on fait une gamme témoin de l'antibiotique.

Ces résultats montrent donc l'intérêt de la filtration car elle sensibilise légèrement la méthode, la rendant ainsi plus apte à faire ressortir des différences éventuelles de sensibilité à la pénicillinase entre deux pénicillines voisines à cet égard, comme la pénicilline G et la pénicilline V.

2° *Expérimentation proprement dite.*

Après les quelques tests préalables que nous venons d'exposer, nous avons effectué pour chacune des quatre pénicillines étudiées, une étude en deux temps :

Premier temps : « Quantités croissantes de pénicillinase + quantités constantes d'antibiotique » avec temps d'action constant.

Deuxième temps : « Quantités constantes de pénicillinase et d'antibiotique » mais temps d'action variable.

PÉNICILLINE G

PREMIER TEMPS : « Variation de la concentration en pénicillinase. »

Technique :

On répète les opérations de dilution du test précédent, en passant en série 16 U.S. de pénicillinase. Puis on ajoute la pénicilline G à 1,6 mcg/ml; on laisse 40 minutes en contact au bain-marie; on filtre et on dépose sur un nombre convenable de boîtes de Pétri ensemencées, diverses « perles » dont le capillaire aura été préalablement rempli du liquide des différents tubes. On porte les boîtes à l'étuve pendant 24 heures (où s'opère simultanément la pousse du germe et la diffusion du contenu de chaque « perle ») et au bout de ce temps, on mesure le diamètre des zones d'inhibition obtenues sur la gélose (en millimètres). Nous avons obtenu les résultats suivants (en convertissant les millimètres en mcg/ml à l'aide d'une gamme-témoin de pénicilline) :

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Pénicillinase en U/ml	4	2	1	0,50	0,25	0,12	0,06
Pénicilline G en mcg/ml	←			0,8			→
Temps de contact				40 mn			
Pénicilline G résiduelle	0	0	0,1	0,40	0,65	0,8	0,8
Pénihydrolysée en mcg/ml	0,8	0,8	0,7	0,40	0,15	0	0

Conclusion : « La quantité de pénicilline G hydrolysée est proportionnelle à la quantité de pénicillinase présente dans le milieu. »

Notes techniques :

— les « perles » sont remplies par capillarité, en les amenant doucement à la surface du liquide à tester à l'aide de pinces recourbées; il faut absolument éviter de tremper la « perle » dans le liquide.

— les « perles » sont traitées de la façon suivante avant d'être employées pour la première fois et après chaque dosage : les « perles » sont mises à bouillir dans de l'acide chlorhydrique 5 N et lavées à l'eau jusqu'à ce qu'on n'ait plus de précipité avec le nitrate d'argent. Elles sont séchées à 100°C une nuit, puis chauffées au four à moufle à 500°C pendant 30 minutes. On les stockera dans des boîtes de Pétri stériles.

— la gélose est ensemencée avec une culture de 24 heures en bouillon glucosé de *Sarcina lutea* (variété lisse ou S), à raison de 0,1 ml de bouillon par 20 ml de gélose fondue maintenue à 45-50°C. Le bouillon glucosé initial est ensemencé avec 2 ou 3 colonies de sarcine issues d'une culture de 24 h sur gélose. Quant au bouillon glucosé repiqué quo-

tidiennement, il est abondamment ensemencé (1 ml du bouillon de la veille pour 10 ml de bouillon glucosé).

— les boîtes de Pétri sont coulées en position rigoureusement horizontale (plateau à niveau orientable).

— au cours de chaque réaction pénicilline-pénicillinase on fait une gamme-témoin de l'antibiotique sur gélose en boîtes de Pétri (avec la même gélose que celle servant à couler les boîtes utilisées pour la réaction elle-même).

— pour le nettoyage des filtres en verre fritté, on élue d'abord la pénicillinase adsorbée en les maintenant quelques heures dans la solution alcaline suivante :

Citrate de sodium : 27 g.
Chlorure de sodium : 58,5 g.
Eau distillée : q.s.p. 1 500 ml.

On rince abondamment à l'eau distillée et on les porte à l'autoclave après les avoir disposés sur Kitasato à l'aide de bouchons de caoutchouc perforé. De plus, la partie supérieure de chaque filtre est capuchonnée avec du papier fort. La stérilité des filtres est ainsi conservée à la sortie de l'autoclave. Au moment de la filtration, on se place au voisinage de la flamme d'un bec Bunsen, on ôte le filtre de l'embouchure du Kitasato (jouant exclusivement le rôle de support pour la stérilisation) et on ajuste dans le pied de l'entonnoir de chaque filtre un tube à hémolyse stérile de diamètre légèrement supérieur (dont on vient d'ôter le coton et de flamber l'orifice) ; puis on dispose l'ensemble sur un portoir.

— pour l'utilisation des solutions-stock de pénicillinase, on les met à décongeler dans la glace fondante et on les replace au congélateur aussitôt après usage.

DEUXIÈME TEMPS : « Variation du temps d'action de la pénicillinase. »

Technique :

Dans un lot de 8 tubes analogues aux précédents, on introduit d'abord 1 ml de pénicilline G à 1,6 mcg/ml, puis 1 ml de pénicillinase à 4 U.S./ml sauf le dernier tube qui reçoit 1 ml de pénicilline et 1 ml d'eau distillée (témoin de la pénicilline G).

On porte les tubes au bain-marie à 37°C et on stoppe la réaction de cinq minutes en cinq minutes en retirant le tube I après 5 minutes et en filtrant aussitôt son contenu sur verre fritté; en retirant le tube II après 10 minutes, le tube III après 15 minutes, le tube IV après 20 minutes, le tube V après 25 minutes, le tube VI après 30 minutes, le tube VII après 35 minutes, et en filtrant chaque fois aussitôt. Les différents filtrats sont alors répartis à l'aide de « perles » sur diverses boîtes de Pétri ensemencées avec le germe-test et portées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après ce temps, on mesure les diamètres des zones d'inhibition obtenues et à l'aide d'une gamme témoin de la pénicilline G on calcule sur papier semi-logaritmique les quantités de pénicilline G hydrolysées en fonction du temps. Les résultats sont :

Pénicillinase (U.S./ml)	←——— 2 ———→						
Pénicilline G (en mcg/ml)	←——— 0,8 ———→						
Temps de contact	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'
Pénicilline G hydrolysée en mcg/ml	0,60	0,73	0,75	0,76	0,78	0,8	0,8

PÉNICILLINE V

PREMIER TEMPS : « Variation de la concentration en pénicillinase. »

Technique. — On opère de la même façon que lors du premier temps de l'étude de la pénicilline G et la quantité initiale de pénicillinase est également de 16 U. Les résultats ont été les suivants :

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Pénicillinase (en U.S./ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06
Pénicilline V	←——— 0,8 ———→						
Temps de contact	40 minutes						
Pénicilline V hydrolysée	0,8	0,74	0,63	0,23	0,1	0	0

Conclusion. — « La quantité de pénicilline V hydrolysée est proportionnelle à la quantité de pénicillinase présente dans le milieu. » D'autre part, si l'on compare aux résultats obetnus avec la pénicilline G on note une légère augmentation de stabilité.

DEUXIÈME TEMPS : « Variation du temps d'action de la pénicillinase. »

Technique. — C'est la même que pour le deuxième temps de l'étude de la pénicilline G. Les résultats sont :

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Temps de contact	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'
hydrolysée (en mcg/ml)	0,72	0,73	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74

PHÉNÉTHICILLINE

PREMIER TEMPS : « Variation de la concentration en pénicillinase. »

Technique. — On opère comme précédemment, mais ici la quantité de pénicillinase nécessaire initialement s'est révélée être de 32 U.S./ml au lieu de 16. Ce qui laisse déjà présager

une stabilité supérieure à l'égard de l'enzyme. En effet, les résultats sont :

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Pénicillinase	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12
Phénéticilline (mcg/ml)	←			0,8			→
Temps de contact				40 minutes			
Phénéthicilline hydrolysée (mcg/ml)	0,8	0,70	0,58	0,55	0,40	0,1	0

Conclusion. — « La quantité de phénéthicilline hydrolysée est proportionnelle à la quantité de pénicillinase présente dans le milieu. » En outre, alors que 2 U.S./ml de pénicillinase suffisaient pour hydrolyser 0,8 mcg/ml de pénicilline G, on constate ici qu'il faut 8 U.S./ml pour parvenir au même résultat. Autrement dit, *la Phénéthicilline est quatre fois plus stable que la Pénicilline G* à l'égard de la pénicillinase de *Bacillus cereus*.

DEUXIÈME TEMPS : « Variation du temps d'action de la pénicillinase. »

Technique. — On opère comme précédemment et les résultats obtenus sont superposables aux précédents.

MÉTHICILLINE

PREMIER TEMPS : « Variation de la concentration en pénicillinase. »

Technique. — On opère comme précédemment, mais ici la quantité de pénicillinase nécesaire initialement est consi-

dérablement plus élevée que pour les trois pénicillines précédentes. En effet, elle est de l'ordre de 3 200 U.S./ml, au lieu de 16 pour la pénicilline G et V et de 32 pour la phénéthicilline. D'autre part, la concentration initiale de méthicilline par ml est de 20 mcg/ml, contre 1,6 mcg/ml pour les trois cas précédents. Les résultats sont :

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII
Pénicillinase (U./ml)	800	400	200	100	50	25	12,5
Méthicilline (mcg/ml)	←———			10	—		———→
Temps de contact				40 minutes			
Méthicilline hydrolysée (mcg/ml)	10	10	9	7,5	5	0	0

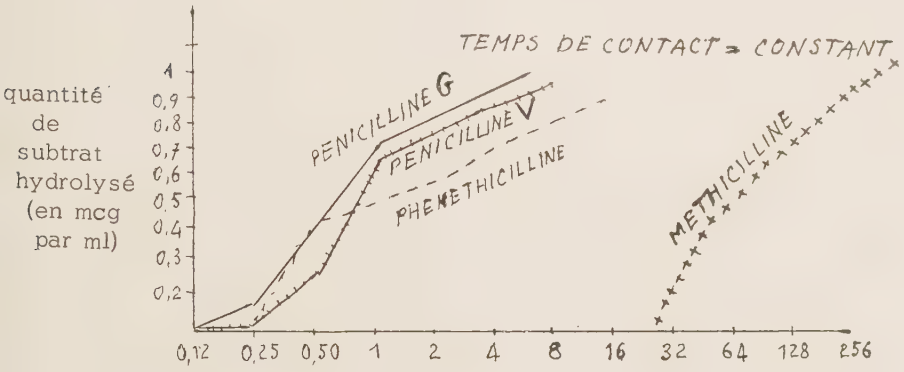
Conclusion. — « La quantité de méthicilline hydrolysée est proportionnelle à la quantité de pénicillinase présente dans le milieu. » D'autre, part, on peut noter que la quantité de pénicillinase nécessaire pour provoquer un début d'hydrolyse est 200 fois plus élevée que pour la pénicilline G et que celle nécessaire pour hydrolyser 50 % du substrat est 100 fois supérieure. Autrement dit, *la Méthicilline est cent à deux cents fois plus stable que la Pénicilline G* à l'égard de la pénicillinase de *Bacillus cereus*.

DEUXIÈME TEMPS : « Variation du temps d'action de la pénicillinase. »

Technique. — On opère comme pour le deuxième temps des trois pénicillines précédentes et les résultats sont superposables.

On peut essayer de reporter sur un graphique les résultats obtenus pour le premier temps des quatre pénicillines

étudiées, à condition de poser que la concentration de 10 mcg peut être assimilée en abscisses à la concentration initiale équivalente de 0,8 mcg utilisée pour les trois autres pénicillines :



Concentration de pénicillinase
(en Unités Schenley par ml)

Stabilité comparée de quatre pénicillines en présence de quantités croissantes de pénicillinase de *Bacillus cereus*.

B. MÉTHODE D'ÉTUDE DU POUVOIR INHIBITEUR D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE SUR LA PÉNICILLINASE

L'intéressant problème des inhibiteurs de la pénicillinase a été l'objet de nombreux travaux, comme nous l'avons vu plus haut. Cependant, c'est un problème délicat à aborder et les techniques qui s'y rattachent sont assez complexes. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'essayer de mettre au point une méthode bactériologique facile à réaliser, tout en permettant de cadrer de façon satisfaisante les substances présumées inhibitrices, dans leur action sur la pénicillinase d'une part, mais aussi sur les pénicillines, antibiotiques appelés à être utilisés simultanément et risquant notamment d'être inactivés par l'inhibiteur. La fragilité des pénicillines à l'égard des agents chimiques est en effet bien connue.

I. *Matériel, réactifs et principe de la méthode*

Matériel :

— Tubes en matière plastique (cf. méthode précédente) ;
— « Fish spine beads », n° 3 ou « perles » (cf. méthode précédente).

Réactifs :

— Pénicillinase purifiée « Neutrapen » (cf. méthode précédente) ;
— Pénicilline G, pénicilline V, phénéthicilline et méthicilline sous forme de sels (cf. méthode précédente) ;
— Divers sels métalliques et différentes substances organiques rigoureusement purs.

En outre, le germe-test choisi est le staphylocoque Oxford standard.

Principe de la méthode :

C'est une méthode bactériologique sur boîtes. Pour chaque substance étudiée, on a recours à quatre boîtes de Pétri préparées simultanément, mais de composition différente et dont les indications se complètent les unes les autres.

L'originalité de la méthode réside dans le fait qu'on incorpore l'inhibiteur directement dans la gélose de façon à éliminer une première cause d'erreur importante : la bactériostase insoupçonnée du germe-test faisant prendre pour une inhibition de la pénicillinase, ce qui n'est en fait qu'inhibition de la pousse du germe-test. Ce phénomène se produit quand on fait diffuser l'inhibiteur à la surface de la gélose, à l'aide d'un disque ou d'une « perle » par exemple.

D'autre part, la pénicillinase est également incorporée à la gélose. En fait, deux boîtes de Pétri seulement sur les quatre reçoivent de la pénicillinase. Les deux autres servent de témoin de la stabilité de la pénicilline présente dans les « perles » et de témoin de la pousse du germe-test. En effet, on dépose à la surface de chaque boîte, quatre « perles » préalablement remplies d'une concentration déterminée de pénicilline (pour chacune des quatre pénicillines étudiées,

on entreprendra une étude séparée). Tout effet inhibiteur de la pénicillinase entraînera un accroissement du diamètre de la zone d'inhibition concentrique à chaque « perle ». En effet, la concentration en pénicillinase de la gélose a été calculée de façon telle que la pénicilline diffusant ne soit que partiellement hydrolysée.

II. *Détail de l'expérimentation et résultats*

Pour chaque inhibiteur étudié, on prépare quatre boîtes de Pétri de la façon suivante : dans quatre tubes à essai en verre de grande taille, on introduit,

Dans le premier :

— 0,5 ml de l'inhibiteur en solution, à concentration infra-bactériostatique pour le germe-test (déterminée dans un test préalable sur boîtes) ;

— 0,5 ml de pénicillinase à 200 Unités Schenley par ml si la pénicilline répartie ultérieurement dans les « perles » est la pénicilline G, la pénicilline V ou la phénéthicilline, et à 2400 U.S./ml si l'on a recours à la méthicilline.

Dans le deuxième :

— 0,5 ml d'eau distillée stérile (à la place de l'inhibiteur) ;

— 0,5 ml de pénicillinase à concentration identique à celle introduite dans le premier tube.

Dans le troisième :

— 0,5 ml de l'inhibiteur à la même concentration que dans le premier tube;

— 0,5 ml d'eau distillée stérile (à la place de la pénicillinase).

Dans le quatrième :

— 1 ml d'eau distillée stérile; puis on ajoute rapidement dans chaque tube 9 ml de gélose fondue (préalablement ensemencée avec le staphylocoque Oxford standard en bouillon de 24 heures, dilué au 1/100e, à raison de 0,1 ml pour 10 ml de gélose fondue) et maintenue entre 45-50°C, on agite et on coule aussitôt au fur et à mesure dans quatre boîtes de Pétri numérotées. On dépose alors sur la première et la deuxième quatre « perles » renfermant respectivement 400, 40, 4 et 0,4 mcg/ml de pénicilline G (ou de pénicilline V ou de phénéthicilline) ou bien 800, 400, 200 et 100 mcg/ml en cas d'utilisation de méthicilline dans le test.

Quant à la troisième et à la quatrième boîtes, ne renfermant pas de pénicillinase, elles recevront chacune quatre « perles » ne contenant respectivement que 0,4, 0,2, 0,1 et 0,05 mcg/ml de pénicilline G (ou V ou phénéthicilline) ou bien 100, 50, 25 et 12,5 mcg/ml dans le cas de méthicilline. Puis on place les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Après 24 heures d'étuve et si le germe-test a poussé sur toutes les boîtes (en cas de bactériostase, inutile d'aller plus loin évidemment), on peut, en comparant les diamètres des zones d'inhibition obtenues sur la première boîte (avec pénicillinase + inhibiteur) et sur la deuxième (avec pénicillinase + eau), établir s'il y a une différence notable de diamètre. Dès lors, si la boîte n° 3 et la boîte n° 4 présentent une pousse bactérienne identique et des zones d'inhibition identiques, on pourra conclure à un inhibiteur de la pénicillinase.

Les principales difficultés de la méthode résident :

a) dans le choix judicieux de la quantité d'inhibiteur à incorporer à la gélose de la première et de la troisième boîte (concentration juste infra-bactériostatique) ;

b) dans le choix judicieux de la quantité de pénicillinase à ajouter à la première et à la deuxième boîte. Cette quantité doit être telle que la zone d'inhibition de la « perle » à 400 mcg/ml (ou à 800 mcg/ml dans le cas de la méthicilline) soit au maximum égale à 20 mm et au minimum à 10 mm. Dans ce cas, tout effet inhibiteur sur la pénicillinase de la boîte I de la part de la substance étudiée se traduira par une variation de diamètre décelable de la zone d'inhibition.

Enfin, l'inhibiteur doit être soluble dans l'eau.

Nous avons expérimenté de la sorte les principaux inhibiteurs de la pénicillinase connus, ainsi que diverses substances présumées inhibitrices.

Résultats :

1. Les sels ferreux, notamment le chlorure et le sulfate, se révèlent intéressants à la concentration de 5 pour mille, en présence de pénicilline G, de pénicilline V et de phénéthicilline. Par contre, la méthicilline se montre très fragile en présence d'ion ferreux à cette concentration.

2. Parmi les sels de calcium solubles, le chlorure de calcium à la concentration de 10 pour mille présente des propriétés inhibitrices pour la pénicillinase et n'a pas d'effet secondaire sur les quatre pénicillines.

3. Les iodures, le sulfate de magnésium (à la concentration de 10 pour mille), le fluorure de sodium en solution saturée, ne sont que faiblement inhibiteurs.

4. Le benzimidazole, la xylocaïne, la rongalite, par contre, se sont avérées dépourvues de propriétés inhibitrices aux concentrations infra-bactériostatiques.

Nous n'avons pas disposé d'un temps suffisant pour poursuivre nos investigations, mais nous pensons que cette méthode aurait pu permettre de parvenir à des résultats intéressants dans ce domaine.

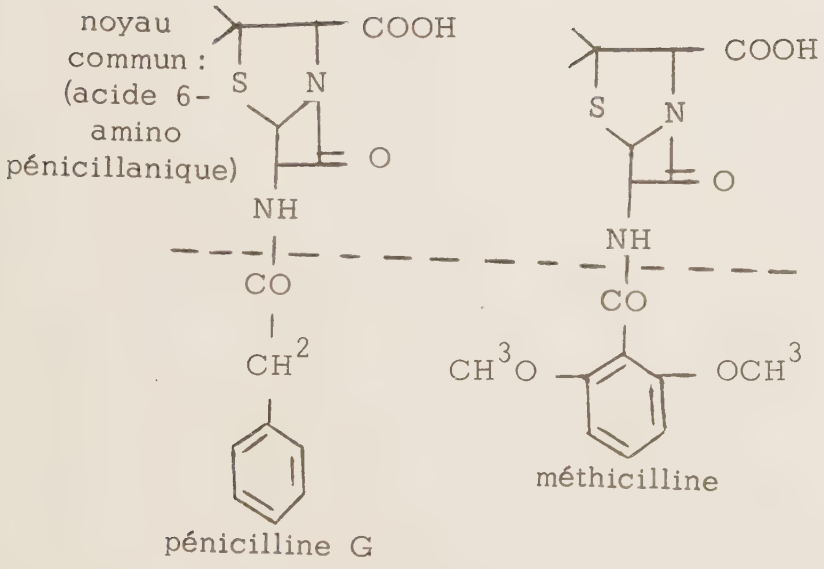
DISCUSSION

Avant de tirer quelques conclusions générales sur l'étude que nous avons entreprise, nous allons essayer de discuter de quelques problèmes d'actualité particulièrement attachants.

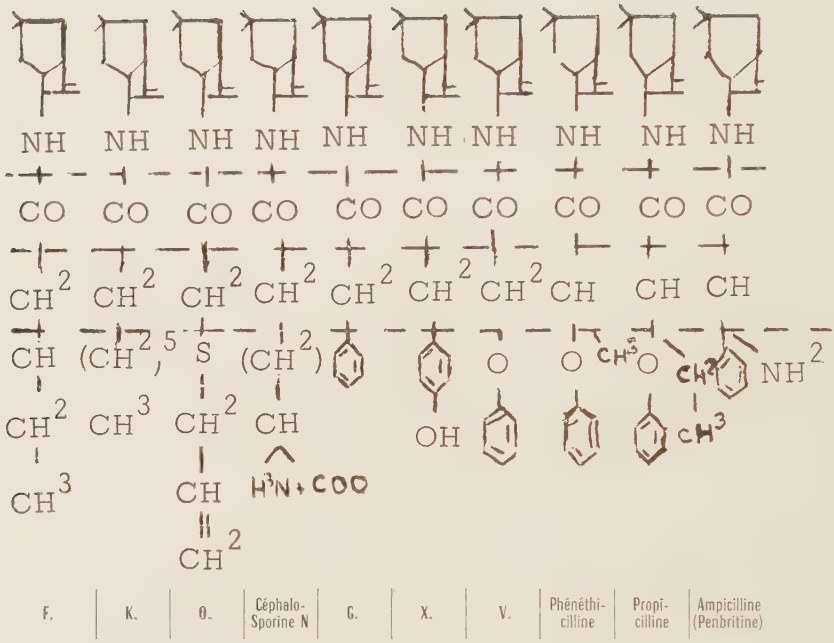
I. HYPOTHÈSES PERMETTANT D'EXPLIQUER LA GRANDE STABILITÉ DE LA MÉTHICILLINE A L'ÉGARD DE LA PÉNICILLINASE

Nous abordons là un sujet fort délicat et nos hypothèses tendant à expliquer la grande stabilité de la méthicilline à l'égard de la pénicillinase, seront tout à fait gratuites, ne s'appuyant sur aucun travail expérimental.

Si l'on se penche avec attention sur la formule chimique de la méthicilline, on s'aperçoit qu'elle diffère assez peu de la pénicilline G, particulièrement labile à l'égard de l'enzyme précédent, et que leur noyau, point d'impact classique de l'hydrolyse, est strictement semblable. Or, on a démontré récemment que ce fameux noyau (ou acide 6-amino-pénicillanique), mis en présence de pénicillinase staphylococcique, se révélait vingt fois moins stable que la méthicilline, mais quinze fois plus stable que la pénicilline G. Autrement dit, la méthicilline tirerait sa stabilité de sa chaîne latérale, alors que cette dernière fragiliserait en quelque sorte la pénicilline G à l'égard de la pénicillinase staphylococcique.



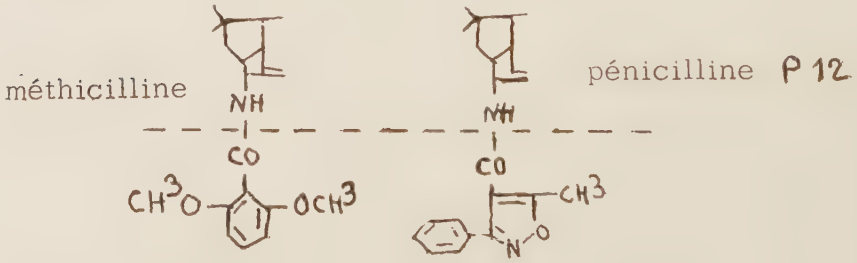
Si nous considérons les chaînes latérales de ces deux pénicillines, ce qui frappe d'emblée est la disparition du maillon carboné intermédiaire — CH_2 — et il semble bien, en fait, que tout le problème de la sensibilité à la pénicillinase réside dans ce simple groupement carboné. En effet, si l'on a la curiosité de placer côte à côte, d'une part, toutes les pénicillines sensibles à la pénicillinase, y compris la phénéthicilline, l'ampicilline (penbritine) et la propicilline (pénicillines « nouvelles » n'apportant précisément aucun progrès sensible dans ce domaine), on constate qu'elles présentent toutes, sans exception, ce fameux maillon carboné — CH_2 — sur leur chaîne latérale :



Pénicillines sensibles à la pénicillinase

Cette particularité chimique en fait des dérivés de l'acide acétique, de formule générale R-CO-CH_2-R'.

Au contraire, les deux seules pénicillines « nouvelles » qui, à notre connaissance, résistent à la pénicillinase, à savoir la méthicilline et l'acide méthyl-phényl-isoxazolyl-pénicillanique (prostaphline ou P_{12}), ne possèdent plus ce maillon — CH_2 — sur leur chaîne latérale :



Pénicillines stables à l'égard de la pénicillinase

Ce qui fait de ces deux dernières pénicillines les homologues inférieurs des précédentes, c'est-à-dire des dérivés bisubstitués de l'acide formique : R-CO-R'.

Il est évident que cette constatation intéressante n'apporte pas pour autant une explication intime de la stabilité à la pénicillinase témoignée par la méthicilline, mais elle permet peut-être de s'engager plus au cœur du problème en laissant entrevoir, à l'aide de la configuration stéréochimique de ces substances, un ensemble électro-négatif beaucoup plus stable électriquement et chimiquement; lequel protégerait le fragile pont lactame à l'égard des agents hydrolysants et en particulier à l'égard de la pénicillinase. Quant à l'assertion de certains auteurs selon laquelle on aurait affaire avec la méthicilline à un composé inactivé selon un processus différent du schéma classique, elle semble difficilement acceptable, car le comportement de la méthicilline à cet égard est absolument superposable à celui des autres pénicillines, nécessitant seulement, comme nous l'avons montré dans nos travaux personnels, des concentrations de pénicillinase beaucoup plus élevées.

II. L'AVENIR DE LA MÉTHICILLINE

Tout d'abord il faut bien se pénétrer de l'idée que la méthicilline se distingue nettement des autres pénicillines utilisées à l'heure actuelle en France et notamment de la phénéthicilline, autre pénicilline « nouvelle ». C'est pourquoi il serait maladroit par exemple de vouloir envisager globalement l'avenir des nouvelles pénicillines. Si l'on peut prédire à la phénéthicilline une longue carrière, dans la plupart des indications où la pénicilline G s'est révélée stable, comme dans le domaine des streptococcies par exemple, il n'en est pas de même de la méthicilline. En effet, son spectre est beaucoup plus restreint en fait et se limite pratiquement, rappelons-le, aux staphylocoques producteurs de pénicillinase. Donc, vouloir discuter de l'avenir de la

méthicilline, c'est un peu vouloir discuter de l'avenir des staphylocoques pénicillino-résistants, bactéries redoutables et susceptibles d'adaptations les plus inattendues, et l'on saisit bien vite les dangers d'une telle entreprise et son côté passionnant à la fois.

La première idée à laquelle on ne peut s'empêcher de songer est l'assez grande rapidité avec laquelle émergèrent les souches pénicillino-résistantes lors de la généralisation de la pénicilline G en thérapeutique. Pourtant Fleming lui-même ne déclarait-il pas au moment de sa découverte qu'il avait rencontré exceptionnellement des souches de staphylocoques « presque insensibles » à cet antibiotique. Sans vouloir mésestimer les possibilités d'adaptation de ces dernières bactéries, on doit cependant reconnaître que la méthicilline est au départ incomparablement mieux armée que son aînée dans ce domaine, puisque, comme nous l'avons démontré dans nos travaux personnels, sa stabilité envers la pénicillinase est jusqu'à deux cent fois supérieure. Ce qui explique que, jusqu'à présent, les cas d'échec de la méthicilline en face d'un foyer staphylococcique bien irrigué et bien individualisé, se soient révélés très rares; à l'inverse de ce qu'on observa précisément avec la pénicilline G, vis-à-vis de laquelle 5 à 10 % des souches de staphylocoques se révélèrent résistantes d'emblée. Expérimentalement, certains auteurs (Jevons, Knight et coll. [40], Daikos et coll. [17]) se sont ingéniés par divers artifices culturaux à isoler, au sein de populations staphylococciques déjà fortement pénicillino-résistantes, les souches les plus fortement productrices dans l'espoir de trouver finalement un mutant « méthicillino-résistant ». Il faut reconnaître qu'ils sont parvenus à un certain résultat dans ce sens, obtenu toutefois *in vitro,* soulignons-le. Il n'est donc pas impossible d'envisager à la longue l'apparition de telles souches en clinique, sans que ce processus soit lié d'ailleurs à l'apparition d'une « méthicillinase » spécifique (ou « celbéninase » pour reprendre l'expression anglo-saxonne), mais plutôt à une hyperproduction de pénicillinase de la

part d'une souche particulièrement virulente. Car il est peu vraisemblable d'envisager une nouvelle hydrolase, étant donné la grande similitude chimique de la méthicilline avec la pénicilline G, notamment en ce qui concerne le noyau de leur molécule, sur lequel porte classiquement, comme on l'a vu, toute la réaction d'hydrolyse. Toutefois on peut prédire sans beaucoup de risques que le processus de méthicillino-résistance sera beaucoup plus long à se dessiner que celui né de l'utilisation extensive de la pénicilline G. D'autant plus que l'usage de la méthicilline est nécessairement beaucoup plus limité que celui de la pénicilline G, ce qui diminuera d'autant les risques de sélection involontaire de souches très fortement productrices. Certains auteurs particulièrement optimistes vont même jusqu'à avancer que l'usage de la méthicilline, en éliminant les souches de staphylocoques pénicillino-résistantes, fera peu à peu régresser leur nombre, renversant en quelque sorte l'évolution désastreuse amorcée dans ce domaine depuis le début de la pénicillinothérapie. Ainsi on rapportait récemment que la vaporisation de méthicilline dans les salles d'hôpital semblait diminuer le nombre des souches pénicillino-résistantes.

Toutefois, dans les conditions actuelles d'utilisation de cet antibiotique, nécessitant une posologie très élevée pour réaliser des concentrations minima inhibitrices convenables, on peut se demander si on ne s'exposera pas, plus qu'avec la pénicilline G, à un traitement inefficace, de sorte que les risques d'induction (précisément favorisés par les doses infra-bactériostatiques) ne seront pas fortement augmentés.

III. LES ESPOIRS QUE LA MÉTHICILLINE FAIT NAITRE

La découverte de la méthicilline par l'École anglo-saxonne, venant après l'isolement industriel du noyau des pénicillines, a créé soudain un renouveau d'intérêt considérable à l'égard de la pénicilline et cela est bien légitime. En effet, cette

nouvelle substance n'est que le point de départ d'une série de découvertes fructueuses théoriquement inépuisables. Cette merveilleuse perspective est née, rappelons-le, de la remarquable découverte initiale d'un procédé industriel de fabrication du noyau des pénicillines (1959). Depuis cette date, une formidable émulation s'est créée parmi les chercheurs pour greffer par voie synthétique sur ce noyau les chaînes latérales les plus variées. Rien n'empêchait de penser, en effet, que l'on parviendrait finalement par cette voie à l'obtention d'une pénicilline active également contre les bactéries gram négatives, administrable par voie orale, indifférente à la pénicillinase bactérienne, dépourvue d'action allergisante, génératrice de taux sanguins plus élevés et plus durables, et pourquoi pas active contre un grand nombre de virus. Il faut reconnaître que nos espoirs n'ont pas été déçus, puisque nous avons assisté tour à tour à la synthèse d'une pénicilline à spectre élargi et administrable *per os* : l'ampicilline (penbritine) ou acide 6-amino-phényl-acétamido-pénicillanique (inactivé toutefois par la pénicillinase) ; à la synthèse d'une pénicilline orale comparable à la phénéthicilline, mais réalisant des taux sanguins vingt fois supérieurs : la propicilline (brocilline) ou phénoxy-propyl-pénicilline ; à la synthèse d'une pénicilline orale (moins stable toutefois que la phénéthicilline en pH acide) et de stabilité comparable à la méthicilline à l'égard de la pénicillinase : l'acide méthyl-phényl-isoxazolyl-pénicillanique (prostaphline ou pénicilline P_{12}), présentant toutefois un « protein-binding » plus élevé que la méthicilline dans le sérum. Il faut signaler, toutefois, que ces dernières nées de l'industrie des pénicillines ne sont pas encore commercialisées en France.

Ces quelques données doivent suffire à nous faire mesurer l'importance des espoirs nés de la découverte de la méthicilline et les chances renouvelées de la pénicillinothérapie.

CONCLUSIONS

I. L'isolement inespéré du noyau des pénicillines à l'état pur et en quantité industrielle et la possibilité nouvelle offerte aux chimistes de greffer synthétiquement sur ce « nucleus », les chaînes latérales les plus variées, a permis à la thérapeutique de s'enrichir de nouvelles acquisitions très intéressantes, telles que la méthicilline et la phénéthicilline. Mais il laisse surtout entrevoir la découverte prochaine de pénicillines notablement améliorées sur le plan pharmacologique et sur le plan de leur spectre antibactérien.

On doit désormais reconsidérer la place de la pénicilline dans l'antibiothérapie et l'envisager comme le chef de file d'une vaste famille d'antibiotiques majeurs en pleine expansion, les « pénicillines », appelées sans doute à dépasser en importance tous les autres groupes actuels d'antibiotiques et à reprendre la première place de l'antibiothérapie.

La plus importante critique qu'on pouvait formuler à l'encontre des pénicillines classiques, était leur inefficacité contre la pénicillinase bactérienne. Le progrès actuel le plus notable réside dans la découverte d'une pénicilline nouvelle échappant dans une large mesure à l'action de cette diastase. C'est pourquoi nous avons tenté tout au long de notre travail de faire le point de nos connaissances actuelles sur la pénicillinase et d'étudier expérimentalement la réaction pénicilline-pénicillinase, aussi bien pour les pénicillines classiques que nouvelles.

II. Nos travaux personnels montrent, d'une part, à l'aide de données numériques précises et par une méthode purement bactériologique, l'exceptionnel comportement de la méthicilline à l'égard de la pénicillinase de *Bacillus cereus*

et les différences considérables existant dans ce domaine entre la méthicilline d'une part et la pénicilline G, la pénicilline V et la phénéthicilline d'autre part. La méthicilline a une stabilité cent à deux cent fois supérieure à la pénicilline G et à la pénicilline V et vingt-cinq à cinquante fois supérieure à la phénéthicilline.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de mettre au point une méthode d'étude bactériologique simple des inhibiteurs de la pénicillinase grâce à laquelle nous avons pu notamment mettre en évidence l'intérêt des sels ferreux et des sels de calcium dans ce domaine, mais aussi l'exceptionnelle fragilité de la méthicilline à l'égard des premiers.

III. Dans le domaine de la pénicillinase, il faut retenir l'élargissement très net de nos connaissances dans toutes les directions, notamment sur le plan physico-chimique et immunologique, tout en regrettant cependant qu'elles se limitent encore en grande partie à la pénicillinase de *Bacillus cereus*. La pénicillinase staphylococcique semblerait en effet, plus proche de nos préoccupations thérapeutiques.

Cependant, de toutes les données actuelles sur la pénicillinase, il semble que seule la parfaite connaissance du mécanisme d'induction de cet enzyme soit susceptible de nous faire progresser efficacement dans la lutte directe contre cette redoutable diastase bactérienne. On sera dès lors en mesure, en y associant l'action indirecte de la méthicilline ou d'un de ses succédanés, de juguler définitivement les affections à staphylocoques producteurs.

IV. La méthicilline, nouveau fleuron du groupe des pénicillines, vient combler une grave lacune de la pénicillinothérapie classique dans la lutte contre les staphylocoques producteurs de pénicillinase, où elle se révèle étonnamment efficace, tout en conservant les remarquables critères intrinsèques de la molécule de pénicilline. Malheureusement, son utilisation se heurte à des difficultés. Son efficacité pondérale notablement inférieure à celle de la pénicilline G en particulier, la rend peu intéressante dans les domaines classiques d'utilisation de la pénicilline G et limite en fait son emploi

aux staphylocoques producteurs de pénicillinase, répétons-le. C'est pourquoi, avant de mettre en œuvre un traitement par la méthicilline, il faudra, dans la mesure du possible, demander au laboratoire si l'on a bien affaire à un staphylocoque producteur de pénicillinase.

V. La phénéthicilline, autre pénicilline « nouvelle », vient prendre en quelque sorte le relais de la pénicilline V. Elle permet, en effet, d'obtenir des taux sanguins supérieurs, comparables à ceux obtenus avec la pénicilline G par voie parentérale; en outre, elle présente une stabilité légèrement accrûe à l'égard de la pénicillinase bactérienne, comme nous l'avons vu dans nos travaux personnels. Elle s'avère donc particulièrement intéressante en pénicillinothérapie classique, chez l'enfant notamment, car elle permet l'abandon de la seringue sans aucun préjudice d'efficacité.

Vu : *Le Président,*

ANDRIEU.

Vu : *Le Doyen,*

LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Toulouse, le 14 juin 1962.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Abraham, Baker, Boon, Calam et Carrington. — The chemistry of penicillin. *Princeton University Press,* chap. 2 N.J. (1949).

[2] Abraham (E.P.) et Chain (E.). — An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature,* 1940, 146, 837.

[3] Barber (M.). — Drug resistance of staphylococci with special reference to penicillinase production. Ciba foundation symposium. *J.A. Churchill Ltd,* 1957, London.

[4] Batchelor (F.R.), Doyle (F.P.), Nayler (J.H.C.) and Rolinson (G.N.). — Synthesis of penicillin = 6-amino-penicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature,* 1959, 183, 257.

[5] Baudet et Hagemann. — *Experientia,* t. 10, p. 374, 1954.

[6] Becker (R.). — Effet de la pénicillinase sur la pénicilline circulante. *The New England Journal of Medicine,* vol. 254, n° 20, p. 952 (1956).

[7] Behrens (O.K.) et Garrison (L.). — Inhibitors for penicillinase. *Arch. Biochem.* (1950), 27, I, 94.

[8] Bondi (A.), Saint-Phalle (M.), Kornblum (J.) et Moat (A.G.). — Les facteurs influençant la synthèse de la pénicillinase par le staphylocoque doré. *Arch. of Bioch.* (1954), 52-53, 348.

[9] Bourse (R.). — Bacille pyocyanique et antibiotiques. *Thèse Médecine,* Toulouse, 1956, Imp. Cléder.

[10] Bowmann (F.W.) et Holdowsky (S.). — Production and control of a stable penicillinase. *Antibiotics et Chemotherapy,* vol. X, n° 8, août 1960.

[10 *bis*] Brunner (R.), Kraushaar et Prohaska (E.). — Inhibition of penicillinase and reduction of resistance *in vitro* in staphylococci by surface-active substances. *Antibiotics annual,* 1959-1960, pp. 169-174.

[11] *Bulletin de l'Institut Pasteur* (1957). — Possibilité d'obtenir des staphylocoques non producteurs de pénicillinase à partir de staphylocoques producteurs, en les cultivant à 44°C. 55, 12, 3661.

[12] Carr (E.A.). — A comparative study of inhibition of penicillinase by simple compounds, antiserum, and their combinations. *Antibiotics annual* (1959-1960) 161-74.

[13] Cassagne (H.). — Méthode de préparation de la pénicillinase du bacille subtil. Milieux de culture, tome 2; Editions La Tourelle Saint-Mandé. Collections « Techniques de Base » (1961).

[14] Citri (N.). — Concentrated and purified penicillinase. *Israeli,* 12, 061, 23 juin 1960.

[15] *Codex Français.* Edition de 1949, p. 543.

[16] *Conférence de Syracuse,* sur la 2-6 diméthoxy-phénylpénicilline. A new synthetic penicillin. N.Y., 7 septembre 1960.

[17] Daikos (G.K.), Kourkoumeli, Kontomichalou et Paradelis (A.). — Comparative *in vitro* studies with the synthetic penicillins; development of resistance by staphylococcus to 6-(2-6 diméthoxybenzamido)-penicillin. *Antibiotics et Chemotherapy,* n° 8, août 1961, vol. II, pp. 491-497.

[18] Delpech (J.). — Les antibiotiques en ophtalmologie. *Thèse Médecine,* Toulouse (1962), Imp. du Sud.

[19] Douthwaite (A.H.) et Trafford (J.A.P.); Knox (R.) et Stewart (G.T.); Knudsen (E.T.), Rolinson; Stewart, Nixon (H.H.) et Coles (H.M.T.). BRL 1241, *British Medical Journal,* 3 sept. 1960, pp. 687-710.

[20] Eriksen (K.R.) et Hansen. — Observations on the extracellular nature of staphylococcal penicillinase. *Acta pathol. et microbiol. Scandinav.,* 35, 169 (1964).

[21] Fairbrother (R.W.). — Mixed staphylococcal infections. The development of penicillin resistant strains. *Lancet,* 1956, 270, 716-718.

[22] Farrington (J.). — Reactions to antibiotics, with special reference to penicillin. *South M. J.,* 48, 657, 1955.

[23] Fisher (A.A.). — Extrait d'un rapport sur les aspects médico-légaux des tests de détection de l'allergie à la pénicilline. *Arch. of Derm.,* 1961, 84, 331-334.

[24] Fleming (E.). — *British journal experimental pathology,* t. 10, p. 226, 1929.
[25] Fleury (P.), Schuster (G.), Dessus (M.), Roux-Delimal (J.) et Morel (A.). — *Ann. Pharm. Fr.,* t. 7, p. 529, 1949.
[26] Foster (J.W.). — *Science,* 101, 205 (1945).
[27] Frank (P.F.) and Mc Guigan (P.). — Studies on the alteration of penicillin resistance among staphylococci employing antipenicillinase immune serum. *Bacteriol. Proc.,* 62-63, 1959.
[28] Frankel (D.B.) and Stutsman (R.E.). — The prophylaxis of penicillin reactions with chlorprophenpyridomine maleate injection. *Ann. Allergy,* 13, 563, 1955.
[29] Garrod (L.P.). — *Médecine et Hygiène,* 10 oct. 1960, n° 476.
[30] Geronimus (L.H.) et Cohen (S.). — Inducibility of penicillinase in hospital strains of staphylococci. *Bact. proceeding,* 1958, H. 107, 89-90.
[31] Gourevitch (A.), Hunt (G.A.) et Lein (J.). — Structure activity relationships in a series of synthetic penicillin. *Antibiotics et Chemotherapy,* vol. 10, n° 2, fév. 1960.
[32] Hahn (L.). — *Nature,* t. 160, p. 639, 1947.
[33] Halvorson (H.O.). — The induced synthesis of proteins. Advances in enzymology, 1960, vol. XXII, 99-157. *Interscience publishers N.Y.*
[34] Haslett (A.W.). — Nouvelles formes de pénicilline. *Médecine et Hygiène,* nov. (1959).
[35] Henry (R.J.) et Housewright (R.D.). — Studies on penicillinase. *The journal of Biol. Chemistry,* 1947, 167, 553-557.
[35 *bis*] Hyman (A.L.). — Choc anaphylactique après traitement par la pénicillinase. *J.A.M.A.,* 169, 593, 1959.
[36] Huriez (C.), Desmons (F.), Agache (P.), Baelden (J.), Monnier (J.C.), Théry (C.), Wallaert (C.). — Etude clinique et biologique de la pénicillinase, au cours de divers incidents de la pénicillinothérapie. *Bull. de Derm. et Syphil.,* 1959, t. 66, pp. 307-319.
[37] Innes (A.G.). — A combined test for penicillinase production and penicillin sensitivity of staphylococci. *The Journal of applied bacteriology,* avril 1960, vol. 23, n° 1.

[38] Karström (H.). — *Ergeb. enzymfosch*, 7, 350 (1937).
[39] Kramer (M.) et Straub (F.B.). — *Acta physiol. Acad. Sci. Hung.*, 11, 139 (1957).
[40] Knight (V.), Steinman (H.) et coll. — A new penicillin derivate resistant to penicillinase, diméthoxy-phényl-penicillin. *Antibiotics et Chemotherapy*, vol. XI, n° 9, sept. 1961.
[41] Knudsen. — Les pénicillines synthétiques. *Médecine et Hygiène*, n° 476, 10 oct. 1960.
[42] Kogut, Pollock et Tridgell. — Propriétés de quelques pénicillinases du genre *Bacillus*. *B.J.*, 62, 391 (1956).
[43] Lebeau (P.) et Janot (M.M.). — *Traité de Pharmacie chimique*, t. V, pp. 3801-3829, 1956.
[44] Levy (G.B.). — Automatic measurement of optical rotation. *Anal. Chem.*, 23, 1089-1092 (1951).
[45] Lippman (H.) et coll. — Induction of staphylococcal penicillinase. *J. Bacter.* (1957), 73, 1, 28-34.
[45 *bis*] Lightborn (J.W.) et Sulitzeanu (D.). — The assay of penicillin in blood serum using Sarcina lutea. *Bull. org. mond. Santé*, 1957, 17, 553-567.
[46] Lowell (F.C.). — Allergic reactions to Sulfonamid and antibiotics drugs. *Ann. Int. Med.*, 43, 333, 1955.
[47] Maas (E.A.) et Johnson (M.J.). — *J. Bacter.*, t. 57, p. 415, 1949.
[48] Manson (E.E.D.) et Pollock (M.R.). — The thermostability of penicillinase. *J. Gen. Microbiol.*, 8, 163, 1953.
[49] Markov (W.). — Das antipenicillinaseserum und die unitare Auffassung der Antikörperwirkung *in vitro*. *Ztschr, Immunitätsforch*, 113, 253, 1956.
[50] McCune (R.M.), Dineen (P.A.P.) et Batten (J.C.). — The effect of antimicrobial drugs on an experimental staphylococcal infection in mice. *Ann. New York Acad. Sc.*, 65, 91, 1956.
[51] Monnier (J.). — Contribution à l'étude des antipénicillines. La Pénicillinase. *Thèse Médecine*, Toulouse, 1948, Imp. du Centre.
[52] Moustardier (G.). — Microbiologie médicale, t. II, 2e édition. Librairie Maloine, 1960.
[53] Murao (S.). — *J. of antibiotics* (Jap.), 1950, 3, 489-493.
[54] Pedersen (K.), Bjergaard et Tonnesen (M.). — *Svensck Farm. Tidskr.*, t. 55, p. 239, 1951.

[55] Penau (H.), Philippe (J.) et Benoist (D.). — Méthode de titrage rapide de la pénicillinase. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, juin 1951, t. IX, p. 419.

[56] Perlstein (D.) et Liebmann (A.J.). — The *in vitro* protection of penicillin from inactivation by penicillinase. *Science*, 102, 174, 1945.

[57] Perlstein (D.) et Liebmann (A.J.). — The production of antipenicillinase immune sera. *Science*, 102, 197, 1945.

[58] Pollock (M.R.). — A simple method for the production of high titre penicillinase. *The journal of pharmacy and pharmacology*, sept. 1957, vol. 9, n° 9.

[59] Pollock (M.R.). — The enzymes. Second edition (1960), vol. 4, chap. 15 (269-279), *Academic Press*.

[60 *bis*] Pollock (M.R.). — Ciba foundation symposium on drug resistance in microorganisms. P. 78, *Churchill*, London, 1957.

[61] Reisch (M.). — Penicillinase therapy; clinical reports of severe reactions. *J.A.M.A.*, 169, 594, 1959.

[62] Rolinson (G.N.), Stevens (S.), Batchelor (F.R.), Wood (J.C.) et Chain (E.B.). — Bacteriological studies on a new penicillin (BRL 1241), *Lancet*, sept. 1960, pp. 564-567.

[63] Rowley (D.), Miller (J.), Rowland (S.) et Lester-Smith. — *Nature*, t. 161, p. 1009, 1948.

[64] Sato (Y.), Barry (G.T.) et Craig (L.C.). *J. Biol. Chem.*, t. 174, p. 217, 1948.

[65] Schepartz (S.A.). — Nature of binding of penicillin by bacterial cells. *Thesis*, State university of Wisconsin, 1955.

[66] Sela (M.). — The effect of urea and guanidine hydrochloride on the enzymatic activity and optical rotation of penicillinase. *American Chemical Society*, 138th Meeting, 11-16 sept. 1960.

[67] Sureau (B.). — La pénicillinase et les inhibiteurs des antibiotiques à comportement enzymatiques. *Thèse Sciences* (Lyon), 1950, Sedes édit. Paris, 1951.

[68] Tacking (R.). — Immunization experiments with penicillinase. *Acta pathol. et microbiol. Scandinav.*, 36, 61, 1955.

[69] Tauber (H.). — The chemistry and technology of enzymes, p. 386, 1955.

[70] Turpin et Velu. — Thérapeutique antibiotique, p. 189. Doin, éditeur, 1957.

[71] Vaczi (L.) et Uri (J.). — Studies on the enzyme penicillinase. Acta microbiol. *Acad. Sci. Hung.* (1954), 2, 167-77.

[72] Vic-Dupont (J.P.), Lamelin (J.P.) et Cartier (F.). — *B.M. Soc. Méd. Hôp. Paris,* 26 janv. 1962, 113, n° 2, 117-122.

[73] Wallmark (G.). — The production of penicillinase in staphylococcus aureus and its relation to penicillin resistance. *Acta patholog. et microbiol. Scandinav.,* 34, 182, 1954.

[74] Welsch (M.). — Pharmacodynamie biochimique, 2e édition. Masson, éditeurs, 1960.

[75] White (A.) et Varga (D.T.). — *Archives of internal. Med.*, nov. 1961, 108, n° 5, pp. 671-77.

[76] Wick (W.E.), Holmes (D.H.) et Boniece (W.S.). — Antipenicillinase serum : use in treatment of resistant staphylococcal infections in laboratory animals. *Antibiotics and Chemotherapy,* vol. X, n° 2, Feb. 1960, pp. 71-77.

[77] Woodruff et Foster. — Bacterial penicillinase. *J. Bact.,* 49, 7, 1945.

[78] Wise (W.S.) et Twigg (G.H.). — The determination of penicillinase activity. *Analyst* (1950), 75, 887, 106-8.

[79] Yamauchi (S.) et Takeda (R.). — Pénicillinase; extraction, purification et propriétés. *J. Fermentation technol.* (Japon) (1949), 27, 197-202.

[80] Zingher (S.) et Teodorovici (Gr.). — Considérations sur la biosynthèse de la pénicillinase et l'obtention d'un sérum antipénicillinasique. *Revista de Chimie* (1959), 2, 101-103.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION. 13

PREMIÈRE PARTIE. — *Revue générale.*

A. *Sur les pénicillines* 17

I. Caractères physico-chimiques :
— Stabilité des solutions vis-à-vis de la chaleur.
— Stabilité des solutions vis-à-vis des pH acides.
— Stabilité des solutions vis-à-vis de la pénicillinase.

II. Caractères pharmacologiques :
Voie d'administration et absorption.
— Taux sanguins.
— Diffusion.
— Toxicité et effets secondaires.

III. Caractères bactériologiques :
— Mode d'action de la pénicilline sur la cellule bactérienne.
— Spectre.
— Mode d'action.
- Résistance.
— Sensibilité à la pénicillinase.

B. *Sur la pénicillinase.* 30

I. Historique.
II. Les diverses pénicillinases.

III. Préparation et purification de l'enzyme.
IV. Nature de la réaction catalysée.
V. Cinétique de la réaction catalysée.
VI. Propriétés enzymatiques (inhibiteurs et activateurs) ; applications pratiques.
VII. Propriétés physico-chimiques.
VIII. Propriétés immunologiques.
IX. Le phénomène d'induction.

Deuxième partie. — *Travaux personnels*..... 70

A. Etude comparative du comportement des pénicillines classiques et nouvelles en face de la pénicillinase.
B. Méthode d'étude des inhibiteurs de la pénicillinase.

Troisième partie. — *Discussion*..... 88

— Les hypothèses pouvant expliquer l'insensibilité relative de la méthicilline à l'égard de la pénicillinase.
— L'avenir de la méthicilline.
— Les espoirs qu'elle fait naître.

Conclusion..... 95

Bibliographie..... 99